



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Instituto de Química**

**Departamento de Bioquímica**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**IQWX01**

**Caracterização estrutural e físico-química dos biossurfactantes  
produzidos por uma cepa de *Burkholderia kururiensis* obtida por  
engenharia metabólica**

**Danielly Chagas de Oliveira Mariano**

**UFRJ/CCMN/IQ/DBQ  
Outubro de 2012**

Danielly Chagas de Oliveira Mariano

Caracterização estrutural e físico-química dos biossurfactantes produzidos por uma cepa de *Burkholderia kururiensis* obtida por engenharia metabólica

**Monografia apresentada à Banca Examinadora como requisito para conclusão do curso de Química com Atribuições Tecnológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro.**

Orientadores: Prof. Dra. Denise Maria Guimarães Freire  
Prof. Dra. Bianca Cruz Neves

Rio de Janeiro, RJ - Brasil  
2012

**Mariano, Danielly Chagas de Oliveira**

**Produção de Biossurfactantes para utilização na indústria do Petróleo – Danielly Chagas de Oliveira Mariano - Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2012.**

**Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Rio de Janeiro, 2012.**

**Orientadores: Prof. Dra. Denise Maria Guimarães Freire  
Prof. Dra. Bianca Cruz Neves**

**1. Biossurfactantes. 2. Raminolipídeos. 3. Hospedeiro heterólogo. 4. Monografia (TCC – IQ/UFRJ). I. Denise M. G. Freire e Bianca C. Neves (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. III. Título.**

*“ O Senhor é a minha luz e a minha salvação;*

*A quem temerei?*

*O Senhor é a força da minha vida;*

*De quem me recearei?”*

*Salmos 27:1*

*“Então romperá a tua luz como a alva, e a tua cura  
apressadamente brotará. e a tua justiça irá adiante de ti; e a glória do Senhor  
será a tua retaguarda.”*

*Isaías 58:8*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que Ele me tem feito. Agradeço por mer dar todas as oportunidades que tenho tido e agradeço ao meu Pai por estar presente sempre comigo em todos os meus caminhos, pois sempre foi Deus que me levantou e com suas palavras me fez seguir adiante com o coração cheio de amor, de alegria e de fé.

Aos meus pais e minha irmã, pelo apoio e amor incondicional a qual a conclusão desta etapa é dedicada a eles principalmente.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Bianca C. Neves, especialmente, que me acompanhou desde meus primeiros passos na Iniciação Científica e que sempre esteve muito acessível para me ajudar em todas as minhas dúvidas e necessidades, quero que saiba que a carrego em meu coração com imenso carinho e com eterna gratidão. Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Bianca e também a Prof<sup>a</sup>. Denise por todos os ensinamentos e pela contribuição na minha formação acadêmica e pessoal.

À ANP pelo apoio financeiro e pelas vantagens proporcionadas ao meu desenvolvimento profissional, e as prof<sup>as</sup>. Jussara Miranda e Cristina Labuto por todos os conhecimentos transmitidos e pelo auxílio dado durante a vigência da bolsa da ANP.

Aos meus grandes amigos que foram ganhos neste período que fiquei no LAMMP e que carinhosamente me deram apelido de “IC Senior”. Não posso deixar de agradecer-los pelo conhecimento, risadas, críticas e por tudo o que vocês representaram para mim, então Luiz, Patrícia, Geléia, Thiago Santiago, Marcelo, Léo, Rosane, Wilber, Gaby, Rafa e todos os outros “LaMMPianos” eu deixo o meu muito obrigada!

Aos meus amigos Livia Gonçalves, Eduardo Coelho, Rafaela Theresa, Renan N. Micha, Henrique Cunha, Gabrielly Peregrino e Mauricio França, Marcus Vinícius Romualdo, Thiago de Olival, Tatiana Pessanha, Aline Vianna, Haryadylla Sindra e todos os outros que fui presenteadada nestes anos de universidade, obrigada pela grande amizade, companheirismo e momentos inesquecíveis (Bons e de Sufoco) que vivemos juntos durante a graduação, posso dizer com toda certeza que todos vocês são mais que amigos, são irmãos!!

À Tia Sônia da secretaria de graduação do IQ. Obrigada por ter resolvido todos os meus problemas com o SIGA!

A todos os novos amigos da Clariant, Roberta, Rafael, Raíssa, Cléia, Patrícia, Silas, Claudinha, Eduardo, Géssie, Dona Inês e Seu Cláudio.

Ao meu grande companheiro, Aldo Bazán, por estar ao meu lado com palavras e gestos de amor hoje, amanhã e sempre.

## Sumário

	pág.
<b>Lista de Figuras</b> .....	vii
<b>Lista de Tabelas</b> .....	x
<b>Resumo</b> .....	xi
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	6
2.1. Biorremediação.....	8
2.2. Surfactantes.....	9
2.3. Biossurfactantes e Raminolipídeos.....	11
2.4. Técnicas de Caracterização dos Raminolipídeos.....	15
2.4.1. Físico-Química.....	15
2.4.2. Estrutural.....	16
2.4.2.1. Cromatografia.....	16
2.4.2.1.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	17
2.4.2.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance ( <i>HPLC</i> ).....	17
2.4.2.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	17
2.4.2.3. Espectrometria de Massas.....	18
2.4.2.3.1. Fonte de Íons.....	19
2.4.2.3.2. Analisador de Massas.....	25
<b>3. Objetivos</b> .....	30
<b>4. Experimental</b> .....	31
4.1. Cultivo e Produção dos Biossurfactantes.....	31
4.1.1. Bactérias e Plasmídeos Empregados.....	31
4.1.2. Meios e Condições de Cultivo.....	32
4.1.3. Diversificação das Fontes de Carbono para a Produção de Biossurfactantes.....	32
4.2. Extração.....	32
4.3. Quantificação dos Glicolipídeos.....	33
4.4. Caracterização.....	33
4.4.1. Caracterização Físico-Química.....	33
4.4.2. Caracterização Estrutural.....	34
4.4.2.1. Cromatografia em Camada Delgada.....	34
4.4.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance - <i>HPLC</i> .....	34
4.4.2.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	35
4.4.2.4. Caracterização Estrutural dos Biossurfactantes por <i>LTQ-ORBITRAP VELOS MS</i> .....	35
<b>5. Resultados e discussão</b> .....	37
5.1. Cultivo e Produção dos Biossurfactantes.....	37
5.1.1. Quantificação dos Glicolipídeos.....	37
5.1.2. Diversificação das Fontes de Carbono para a Produção de Biossurfactantes.....	38
5.2. Caracterização dos Raminolipídeos produzidos pela cepa LMM21.....	39
5.2.1. Caracterização Físico-Química.....	39
5.2.2. Caracterização Estrutural dos Biossurfactantes.....	42
5.2.2.1. Cromatografia em Camada Delgada.....	42
5.2.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance – <i>HPLC</i> .....	44
5.2.2.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	45
5.2.2.4. Caracterização Estrutural dos Biossurfactantes por <i>LTQ-ORBITRAP VELOS MS</i> .....	46

<b>6. Conclusões.....</b>	<b>54</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>55</b>
<b>8. Anexo I.....</b>	<b>62</b>

## Lista de Figuras

pág.

Figura 1. Estruturas moleculares propostas para diversos tipos de formação de micelas. Extraído de Sharma <i>et al.</i> , 2012 .....	2
Figura 2. Via biossintética dos ramnolipídeos em <i>P. aeruginosa</i> . Extraído de Soberon-Chavez <i>et al.</i> , 2005. As elipses em azul indicam as duas enzimas (RhlA e RhlB) empregadas na engenharia metabólica da <i>B. kururiensis</i> LMM21.....	3
Figura 3. Distribuição dos sistemas petrolíferos com maiores reservas de petróleo (incluindo-se águas profundas e ultraprofundas). Extraído de Gamboa <i>et al.</i> , 2001.....	6
Figura 4. Acidente causado pela BP. Tentativa de contenção do óleo.....	7
Figura 5. Estrutura molecular de um exemplo de surfactante, onde parte apresenta estrutura hidrofóbica e parte apresenta estrutura hidrofílica.....	10
Figura 6. Interações das moléculas na superfície e no interior de um líquido.....	15
Figura 7. Gráfico representativo da redução da tensão superficial e interfacial em relação ao aumento da concentração de surfactantes.....	16
Figura 8. Esquema geral de funcionamento do Espectrometro de Massas.....	19
Figura 9. Ionização por Electrospray.....	20
Figura 10. Esquema de Ionização Química a Pressão Atmosférica.....	21
Figura 11. Esquema de Fotoionização a Pressão Atmosférica.....	22
Figura 12. Esquema de ionização por <i>DESI</i> .....	23
Figura 13. Ionização por <i>MALDI</i> .....	23
Figura 14. Ionização por elétrons.....	24
Figura 15. Analisador de massas por tempo-de-vôo.....	26
Figura 16. Analisador de massas tipo quadrupolo.....	26



Figura 17: Funcionamento esquematizado do Orbitrap.....	28
Figura 18. Análise de produção de ramnose nas três diferentes cepas em meio mínimo, utilizando glicerol como fonte de carbono. Neste gráfico podemos avaliar que a cepa recombinante <i>B.k.</i> LMM21 apresenta maior produção de glicolípídeos do que as cepas selvagens.....	38
Figura 19. Rendimento da produção de raminolípídeos ao fim de 240 horas de cultivo em meio MSP suplementado com diferentes substratos.....	39
Figura 20. Curva de emulsificação dos sobrenadantes oriundos do cultivo em MSP envolvendo as cepas <i>B. kururiensis</i> KP23 e <i>B. kururiensis</i> LMM21, suplementados com suas respectivas fontes de carbono.....	41
Figura 21. Curva Tensão Superficial dos sobrenadantes oriundos do cultivo em MSP envolvendo as cepas <i>B. kururiensis</i> KP23 e <i>B. kururiensis</i> LMM21, suplementados com suas respectivas fontes de carbono.....	42
Figura 22. Análise do extrato bruto por cromatografia em camada delgada dos biossurfactantes produzidos pela cepa <i>B. kururiensis</i> LMM21 e <i>B. kururiensis</i> KP23, utilizando como padrão interno o raminolípídeo produzido pela <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	43
Figura 23. Perfil cromatográfico das amostras obtidas por <i>HPLC</i> das cepas de <i>B. kururiensis</i> LMM21 (azul), <i>B. kururiensis</i> KP23 (verde) e <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (vermelho).....	45
Figura 24. Espectro de absorção na região do infravermelho das cepas <i>B. kururiensis</i> LMM21, <i>B. kururiensis</i> KP23 e <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	46
Figura 25. Análise por full scan dos raminolípídeos e produzidos pela cepa <i>B. kururiensis</i> LMM21, identificados por <i>ESI-LTQ-Orbitrap hybrid MS</i> .....	48
Figura 26. Identificação dos isotopômeros Rha-Rha-C8C10 e Rha-Rha-C10C8, produzidos pela cepa <i>B. kururiensis</i> LMM21, produtos da fragmentação (MS2) do íon 621,3483 a partir da análise dos fragmentos do íon precursor típicos dessas espécies.....	49

Figura 27. Isolamento do pico isotópico de Rha-Rha-C10C10 de *B. kururiensis* LMM21. A análise foi realizada por *ESI-LTQ-Orbitrap hybrid MS* e o isolamento ilustra um melhor poder de resolução do instrumento, dentro dos parâmetros designados do experimento.....50

## Lista de Tabelas

pág.

Tabela 1. Aplicações variadas dos surfactantes em alguns setores industriais. Extraído de Nitschke & Pastore, 2002.....	11
Tabela 2. Listagem de biossurfactantes principais e seus respectivos microorganismos produtores. Extraído de Nitschke & Pastore, 2002.....	12
Tabela 3. Estruturas químicas de diferentes tipos raminolipídeos.....	29
Tabela 4. Cepas bacterianas empregadas neste estudo.....	31
Tabela 5. Gradiente de eluição das amostras contendo biossurfactantes em <i>HPLC</i> .....	35
Tabela 6. Produção de ramnoipídios (g/L), Índice de Emulsificação (E24%) e Tensão Superficial (mN/m). A partir do sobrenadante livre de células obtidos após cultivo da cepa <i>B. kururiensis</i> LMM21 em meio MSP suplementado com diferentes fontes de carbono, por 240 horas de cultivo, em função da emulsão com diferentes substratos.....	40
Tabela 7. Espécies de raminolipídeos identificadas pela análise do extrato bruto obtido após cultivo da cepa <i>B. kururiensis</i> LMM21 em MSP contendo glicerol como substrato por injeção direta em <i>ESI-LTQ-Orbitrap Hybrid-MS</i> .....	47
Tabela 8. Quantificação relativa da população de raminolipídeos produzidos pela cepa <i>B.kururiensis</i> LMM21. A análise foi realizada por injeção direta em <i>ESI-LTQ-Orbitrap hybrid MS</i> .....	51
Tabela 9. Quantificação relativa da população de raminolipídeos produzidos pela cepa <i>P. aeruginosa</i> PAO1. A análise foi realizada por injeção direta em <i>ESI-LTQ-Orbitrap hybrid MS</i> .....	52

## RESUMO

### PROJETO DE CURSO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS POR UMA CEPA DE *BURKHOLDERIA KURURIENSIS* OBTIDA POR ENGENHARIA METABÓLICA.

ALUNO: Danielly Chagas de Oliveira Mariano

ORIENTADORES: Denise Maria Guimarães Freire

Bianca Cruz Neves

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, possuem caráter hidrofóbico e hidrofílico. Por apresentarem este comportamento, podem diminuir a tensão superficial e interfacial, além de formarem emulsões. Substratos oriundos de fontes renováveis apresentam-se como alternativas economicamente e ecologicamente interessantes para a produção destes compostos. Neste trabalho foi utilizado um hospedeiro heterólogo, *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>, a cepa LMM21, contendo genes oriundos de *P. aeruginosa* PAO1 responsáveis pela produção de mono-raminolípidos. Este biossurfactantes, produzidos em meio de cultivo (MSP) utilizando como fonte de carbono o glicerol foram caracterizados físico-química e estruturalmente. Além disso, foram empregados diferentes óleos como fontes de carbono ao meio de cultivo (MSP), visando observar a produção de biossurfactantes em função dos substratos utilizados.

## 1. INTRODUÇÃO

O petróleo é um composto derivado de matéria orgânica de origem biológica. Quimicamente, o petróleo apresenta milhares de compostos, sendo que dentre os principais componentes estão os hidrocarbonetos, que são hidrofóbicos, como n-alcanos, aromáticos, resinas e asfaltenos (Rahman *et al.*, 2003). Como a sociedade evoluiu em uma velocidade exponencial, principalmente após o início do século XX, o uso do petróleo como matriz energética em outras áreas industriais cresceu em proporção semelhante. Consequentemente, alguns acidentes ambientais envolvendo vazamento de petróleo e seus derivados tornaram-se cada vez maiores e mais comuns.

Neste ambiente, para aceleração dos recursos de biodegradação em ambientes contaminados, como alternativa, são utilizadas técnicas de biorremediação. Uma delas é a aplicação de fósforo e nitrogênio, ajustando-se o pH e o teor de água, normalmente também são adicionadas bactérias. Dentre estes microorganismos, alguns possuem a capacidade enzimática de degradar hidrocarbonetos de petróleo. Estes microorganismos utilizam o petróleo como fonte de carbono resultando na quebra das moléculas em outros compostos de menor massa molecular (Zhang *et al.*, 2005). Além disso, quando os poluentes tem baixa solubilidade em água, são adicionados emulsificantes e agentes tenso-ativos para aumentar a disponibilidade da fonte de carbono poluente (Calvo *et al.*, 2008). A biodegradação é realizada pela diversidade de microorganismos presentes no local.

Surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas por um grupo hidrofílico e outro hidrofóbico que se acumulam em interfaces, diminuindo a tensão interfacial e formando estruturas agregadas conhecidas como micelas (Figura 1). Inseridos na classe de surfactantes, temos os biossurfactantes que são surfactantes produzidos por bactérias e fungos. Comparados aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes possuem algumas características próprias, como um ou mais grupos funcionais e centros quirais, alta degradabilidade, baixa toxicidade, alta atividade surfactante, atividade biológica, baixa sensibilidade às condições extremas de pH, salinidade e temperatura (Kitamoto *et al.*, 2002).

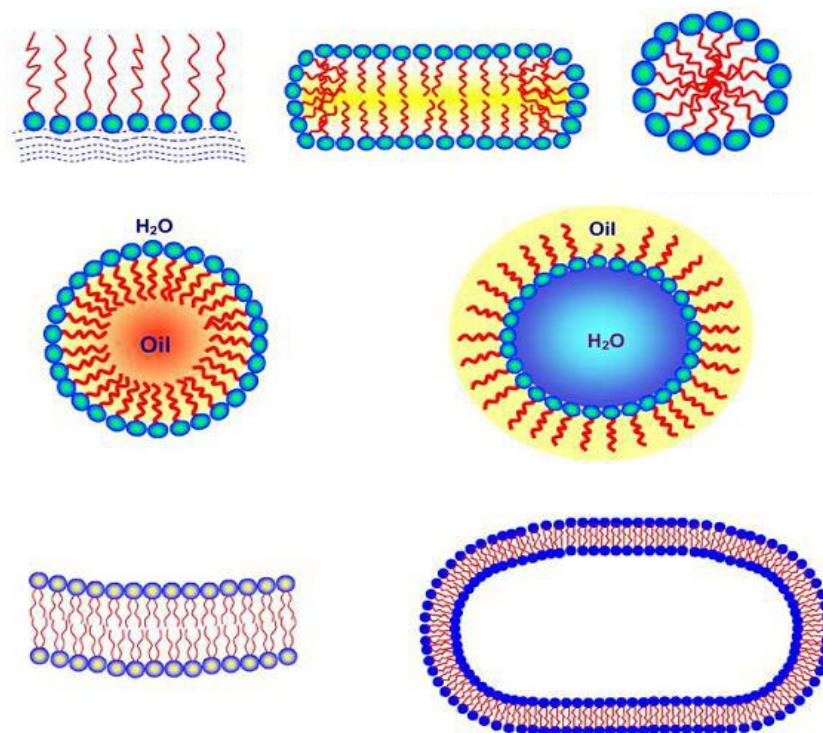


Figura 1. Estruturas moleculares propostas para diversos tipos de formação de micelas. Modificado de Sharma *et al.*, 2012.

Por suas propriedades, estes compostos possuem diversas aplicações em vários setores industriais e ambientais, como por exemplo, o auxílio na determinação da consistência e textura dos alimentos, a dispersão de fases em determinados produtos, a remoção de metais pesados e a remediação de compostos orgânicos hidrofóbicos em solos contaminados .

Um exemplo de um grupo de biossurfactantes que tem sido estudado extensivamente são os raminolipídeos, majoritariamente produzidos pela *Pseudomonas aeruginosa*. Uma de suas principais características é a redução da tensão superficial, como por exemplo, temos a redução da tensão superficial da água, que cai de 72 mN/m para valores entre 25 e 35 mN/m.

Por outro lado, um dos fatores que também contribuem positivamente para trabalhos envolvendo metabólitos produzidos pela *P. aeruginosa* é o fato de que o sequenciamento do seu genoma está disponível, facilitando a manipulação genética e o emprego de tecnologias de biologia molecular. Além do conhecimento do genoma de *P. aeruginosa*, a via biossintética do raminolipídio é bem estabelecida (Figura 2). Tal fato, nos influenciou diretamente na escolha deste microorganismo para otimização da produção de biossurfactantes.

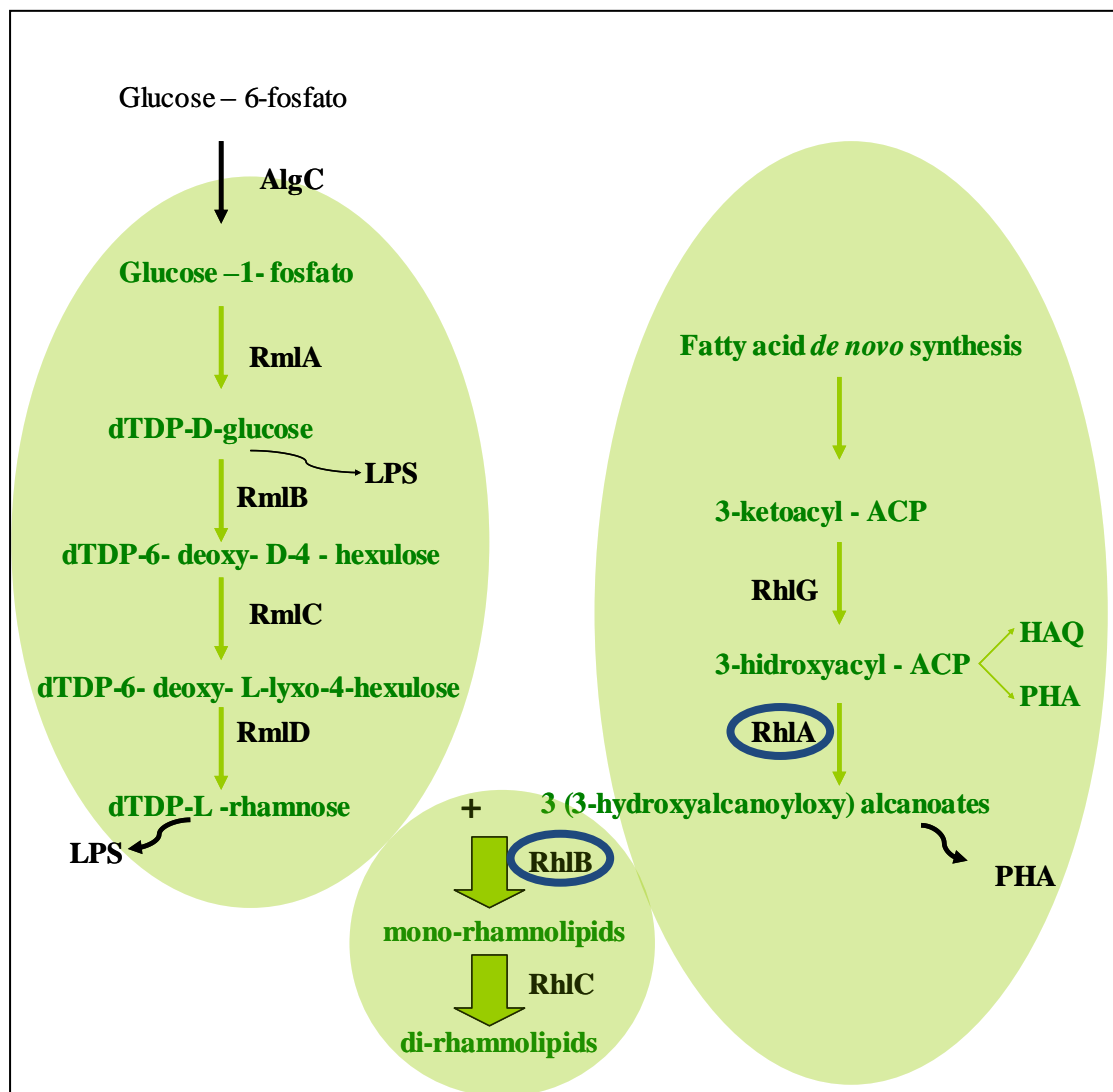


Figura 2. Via biossintética dos raminolipídeos em *P. aeruginosa*. Extraído de Soberón-Chavez *et al.*, 2005. As elipses em azul indicam as duas enzimas (RhlA e RhlB) empregadas na engenharia metabólica da *B. kururiensis* LMM21.

O processo biossintético dos raminolipídeos apresentado na Figura 2, demonstra as ligações metabólicas com outros numerosos produtos de síntese bacterianos, que dependem de outras vias centrais do metabolismo, como as vias biossintéticas dos ácidos graxos e dos açúcares. A figura apresenta também etapas em comum com as vias biossintéticas dos poli-hidróxi-alcanoatos (PHAs, outros compostos de interesse biotecnológico) e de estruturas da superfície celular como lipopolissacarídeos e alginato. Como pode ser observado, os raminolipídeos são produzidos por duas reações sequenciais. A primeira reação é catalisada por um complexo enzimático denominado raminosil-transferase 1 (Rt1), codificada pelo operon *rhlAB* e utiliza dTDP-L-raminose e precursores de ácido  $\beta$ -hidróxi-decanóico, gerando

monoramínolípídeos. Juntamente com dTDP-L-raminose, os monoramínolípídeos, substratos da raminosil-transferase 2 (Rt2), são codificados pelo gene *rhlC*. A enzima RhlG é responsável pelo deslocamento de componentes da fração lipídica dos raminolípídeos, a partir da via biossintética dos ácidos graxos em direção à via biossintética dos raminolípídeos. A segunda reação é controlada pelo operon *rmlBDAC* que codifica as enzimas envolvidas da síntese de dTDP-L-raminose (Soberón-Chavez *et al.*, 2005).

Outra cepa recentemente conhecida e que foi usada neste trabalho é a *Burkholderia kururiensis*, que é uma bactéria não patogênica de vida livre. Esta bactéria foi isolada de ambientes aquíferos poluídos com tricloroetileno no Japão (Zang *et al.*, 2000). Em 2001, foi revelada a sua capacidade de fixar nitrogênio a partir de diferentes fontes em condições de baixa aeração, características ainda não detectadas em outras espécies de *Burkholderia* (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001). Esta bactéria diazotrófica endofítica foi semelhantemente isolada de cultivares de arroz inundado (Rodrigues, 2003). Além da fixação de nitrogênio também foi descoberto que tal cepa também apresenta uma produção substancial de raminolípídeos.

A ideia do nosso grupo foi empregar a *B. kururiensis* como um hospedeiro heterólogo, o que se mostrou promissor, já que os gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* apresentam uma proximidade filogenética entre elas. Estudos demonstraram que dentro do gênero *Pseudomonas* haviam organismos distintos dos demais, e sendo dessa forma, esses organismos foram abrigados como um novo gênero: *Burkholderia* (Gillis *et al.*, 1995). Por ser uma bactéria de vida livre a *Burkholderia kururiensis* não apresenta qualquer marca de virulência, o que confere mais uma vantagem com relação ao uso da *Pseudomonas aeruginosa*.

A reestruturação do metabolismo celular através de manipulação genética foi a estratégia empregada pelo grupo, onde foi gerado uma nova linhagem bacteriana, a *Burkholderia kururiensis* LMM21. Nesta linhagem foi remodelada parte da via metabólica envolvida na biossíntese dos raminolípídeos. Especificamente, realizamos a superexpressão do complexo enzimático RhlAB da biossíntese de raminolípídeos, que resultou em uma produtividade de raminolípídeos substancialmente maior (50-100%), quando comparadas às amostras selvagens. Esta linhagem geneticamente modificada nos proporciona maior eficiência e produtividade aliadas a um menor custo, aos processos de obtenção da glicomolécula em larga escala. A engenharia metabólica tem sido de grande utilidade no desvio de fluxos metabólicos, visando à produção em larga escala de produtos de interesse em biotecnologia, que é a estratégia proposta neste projeto.



Paralelamente, o emprego de hospedeiros heterólogos não-patogênicos para a expressão dos genes de *P. aeruginosa* envolvidos na biossíntese de raminolipídeos representa um importante resultado desta proposta de trabalho. O manuseio de microorganismos não-patogênicos no ambiente laboratorial/industrial constitui uma situação ideal e perfeitamente viável, pois além de reduzir a periculosidade de manipulação, também visa aumentar significativamente a sua produtividade na ordem de 100 a 200%, quando comparada as cepas originais não modificadas geneticamente.

Portanto, o desafio deste projeto consiste na otimização da produção dos biossurfactante obtidos e na caracterização dessas novas moléculas produzidas pela *B. kururiensis* LMM21, oriunda da manipulação genética dos genes *rhlA* e *rhlB*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O petróleo é um composto derivado de matéria orgânica de origem biológica. Durante o processo de formação, o petróleo encontra-se disperso, onde é acumulado por migração em rochas reservatórios formando os poços de petróleo (Speers e Whithehead, 1969) (Figura 3). Devido as condições físicas e químicas que o óleo sofreu em sua geração e armazenamento, cada óleo apresenta características peculiares oriundas da sua formação, como por exemplo, a cor, que pode variar de castanho a negro, a densidade e a composição.

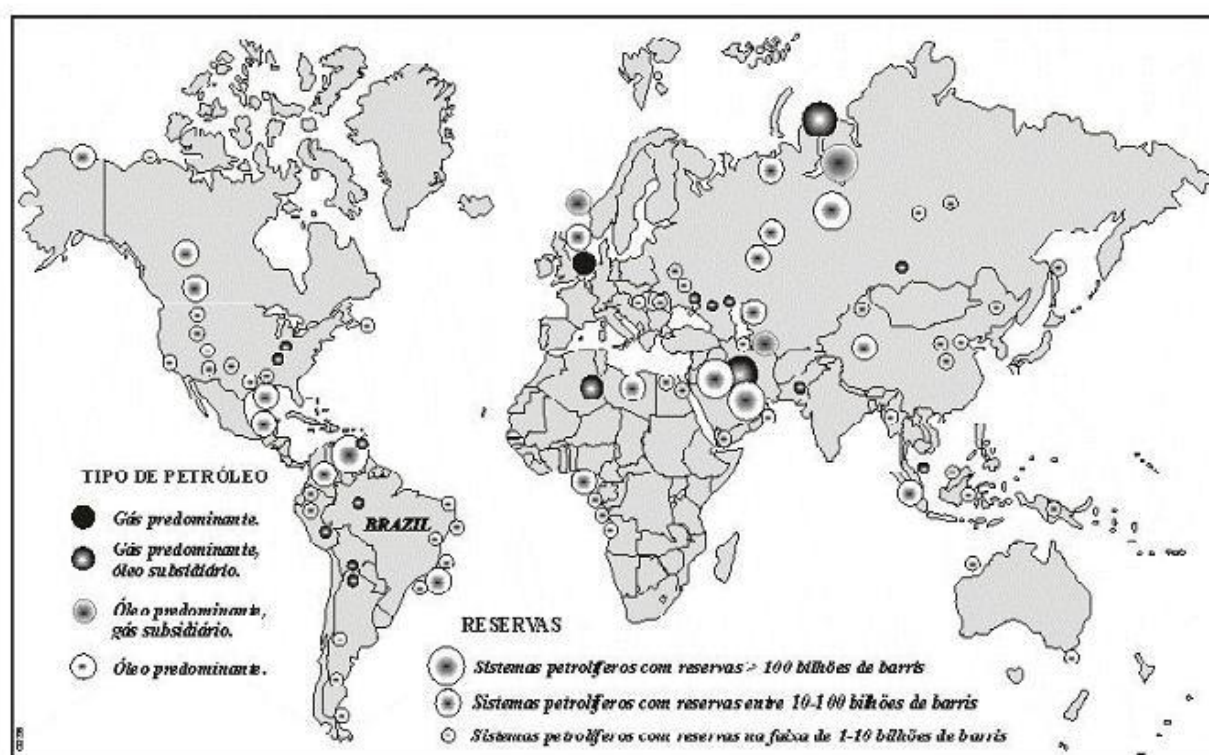


Figura 3. Distribuição dos sistemas petrolíferos com maiores reservas de petróleo (incluindo-se águas profundas e ultraprofundas). Extraído de Gamboa *et al.*, 2000.

Quimicamente, o petróleo apresenta milhares de compostos, sendo que dentre os principais componentes estão os hidrocarbonetos, que são hidrofóbicos, como os n-alcanos, os aromáticos, as resinas e os asfaltenos (Rahman *et al.*, 2003).

Como a sociedade evoluiu em seu crescimento exponencialmente após o início do século XX o uso do petróleo como matriz energética e em outras áreas industriais cresceu em proporção semelhante. Assim acidentes ambientais envolvendo vazamento de petróleo e seus

derivados tornaram-se cada vez maiores e mais frequentes. Com isso centenas de acidentes ambientais marcaram tanto a sociedade como a flora e a fauna.

Dentre estes acidentes ambientais um dos que marcaram foi o desastre que derramou cerca de 700 milhões de litros de petróleo no Golfo do México, nos Estados Unidos, em 2010, por exemplo (Figura 4). A tragédia começou com uma explosão na plataforma Deepwater Horizon da empresa British Petroleum (BP) e provocou um vazamento que se estendeu por quase duas semanas, e causou a maior fatalidade ecológica da história dos Estados Unidos. (Jornal do Meio Ambiente, 2011).



Figura 4. Acidente causado pela British Petroleum. Tentativa de contenção do óleo.  
<http://www.nrfacil.com.br/blog/?p=3661>

Outro desastre marcante foi em novembro de 2002, no qual o petroleiro grego Prestige naufragou na costa da Espanha, despejando 11 milhões de litros de óleo no litoral da Galícia. A resíduo afetou 700 praias e matou mais de 20 mil aves. Em comparação com o Exxon Valdez, a quantidade de óleo derramado foi menor e a biodegradação do produto foi facilitada pelas temperaturas mais altas. Nos meses seguintes ao desastre, o submarino-robô Nautilo soldou o navio afundado a 3 600 metros de profundidade para reduzir o vazamento.

Em 1991, o ditador iraquiano Saddam Hussein ordenou a destruição de cerca de 700 poços de petróleo no país. Mais de 1 milhão de litros de óleo foram lançados no golfo Pérsico ou queimados. A fumaça dos poços bloqueou a luz solar e a fuligem no ar causou problemas

respiratórios à população e ao menos mil pessoas morreram. A mancha viscosa de 1500 km<sup>2</sup> matou 25 mil aves e sujou 600 quilômetros da costa. Além disso, o petróleo se infiltrou no solo prejudicando a germinação das sementes, 40% da água subterrânea foi contaminada e a terra reduziu a capacidade de infiltração da água.

Em março de 1989, o petroleiro Exxon Valdez colidiu com rochas submersas na costa do Alasca e deu início ao mais danoso derramamento de óleo por um navio. O saldo do despejo de 40 milhões de litros de óleo incluiu 100 mil aves mortas e 2 mil quilômetros de praias contaminadas. O problema se agravou porque, no frio, o óleo demora para se tornar solúvel e ser consumido por microorganismos marítimos a biodegradação ocorre com eficácia apenas a partir dos 15 °C. Apesar da limpeza, que mobilizou 10 mil pessoas, cerca de 2% do petróleo ainda continuam poluindo a costa da região.

Esta poluição ambiental causada por liberação de hidrocarbonetos apresenta grandes riscos ao ecossistema e os tratamentos convencionais para remoção do óleo, como por exemplo, adsorção por materiais, contenção e recolhimento através de barreiras flutuantes não fazem a degradação do óleo derramado, por isso, é necessário utilizar técnicas de biorremediação para que a degradação do material seja feita.

## 2.1. BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é um processo que envolve a aceleração dos recursos naturais de biodegradação em ambientes contaminados. Este processo geralmente abrange aplicação de fósforo e nitrogênio, ajustando-se o pH e o teor de água, normalmente também são adicionadas bactérias. Além disso, quando os poluentes tem baixa solubilidade em água são acrescentados emulsificantes e agentes tenso-ativos para aumentar a disponibilidade da fonte de carbono poluente (Calvo *et al.*, 2008).

A biodegradação é realizada pela diversidade de microorganismos presentes no local, e nestes processos são adicionados tensoativos, como por exemplo, os surfactantes, pois estes viabilizam os compostos hidrofóbicos para a conversão microbiana aumentando a taxa de biodegradação (Urum *et al.*, 2004).

Alguns microorganismos possuem a capacidade enzimática de degradar hidrocarbonetos de petróleo. Estes microorganismos utilizam o petróleo como fonte de

carbono resultando na quebra das moléculas em outros compostos de menor massa molecular (Zhang *et al.*, 2005). Portanto alguns microorganismos possuem a capacidade de degradar alcanos, outros decompõem aromáticos e ainda há outros que degradam tanto alcanos quanto aromáticos. Além disso, os próprios microorganismos utilizam várias estratégias para melhorar a disponibilidade desses poluentes hidrofóbicos, tais como formação de biofilme e a produção de biosurfactante (Bognolo, 1999; Christofi e Ivshina, 2002).

Nesse sentido, o crescimento de microorganismos sobre hidrocarbonetos de petróleo tem sido muitas vezes relacionado com a sua capacidade de produção de biosurfactantes, que pode ser biopolímeros de baixo peso molecular, tais como glicolipídeos (Guerra-Santos *et al.*, 1986; Rosenberg e Ron, 1999) e lipopeptídeo (Javaheri *et al.*, 1985; Wilkinson e Galbraith, 1975) ou polímeros de elevado peso molecular, tais como Emulsan (Zuckerberg *et al.*, 1979), Alasan (Navon-Venezia *et al.*, 1995) ou Biodispersan (Rosenberg *et al.*, 1988).

A primeira descrição de uma aplicação biotecnológica de bioemulsionantes em processos de biorremediação hidrocarbonetos foi relatado por Itoh e Suzuki (1972). Eles mostraram que um raminolípido produzido por uma estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* estimulou o crescimento deste microorganismo quando cultivada em meios de cultura contendo hidrocarbonetos. Resultados semelhantes têm sido descritos para os microrganismos, tais como *Corynebacterium* (MacDonald *et al.*, 1981) *Candida* (Kawashima *et al.*, 1983) ou *Rhodococcus* (Martin *et al.*, 1991).

## 2.2. SURFACTANTES

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica (Figura 5). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (Desai e Banat, 1997). Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico).

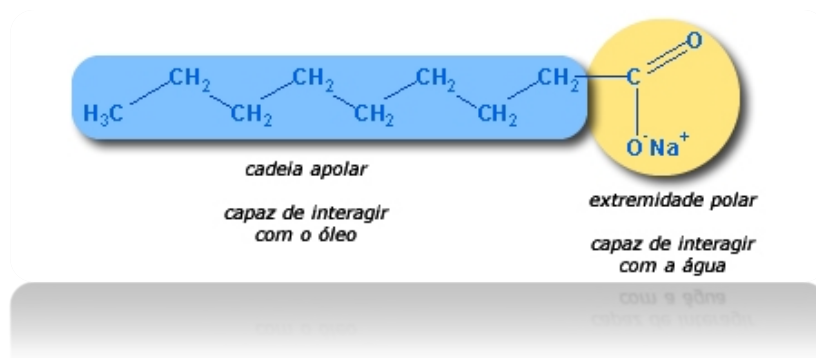


Figura 5. Estrutura molecular de um exemplo de surfactante, onde parte apresenta estrutura hidrofóbica e parte apresenta estrutura hidrofílica.

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes. Estas propriedades fazem os surfactantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. A maior utilização dos surfactantes concentra-se na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), de petróleo, de cosméticos e de produtos de higiene (Tabela 1).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes.

Tabela 1. Aplicações variadas dos surfactantes em alguns setores industriais. Extraído de Nitschke & Pastore, 2002.

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

### 2.3. BIOSSURFACTANTES E OS RAMINOLIPÍDEOS

Os biossurfactantes são tensoativos produzidos por organismos vivos ou derivados de origem biológica. Estas moléculas compõem uma das principais classes de surfactantes naturais, sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Desai, 1993) (Tabela 2).



Tabela 2. Listagem de biossurfactantes principais e seus respectivos microorganismos produtores. Extraído de Nitschke & Pastore, 2002.

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
<b>Glicolipídios</b>	
- ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
- trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
<b>Lipopeptídios e lipoproteínas</b>	
- Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
<b>Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios</b>	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
<b>Surfactantes particulados</b>	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

Os biossurfactantes são empregados em diversas áreas da indústria, que vão desde a indústria petroleira, no controle e retenção de possíveis derramamentos de óleo, à indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, agricultura e também em processos de biorremediação (Nitschke & Pastore, 2002). Na indústria petroleira os biossurfactantes são utilizados na produção de petróleo ou incorporados nas formulações de óleos lubrificantes (Van Dyke, *et al*, 1991), sendo utilizados, por exemplo, para recuperação melhorada de petróleo (MEOR), a qual é uma técnica que consiste em fazer uma recuperação terciária do petróleo utilizando microorganismos ou seus metabólitos para a recuperação de óleo residual. Neste caso o



biossurfactante reduz a tensão superficial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a extração do óleo (Banat, 1995).

Os biossurfactantes também possuem algumas vantagens em relação aos surfactantes químicos, como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, maior compatibilidade com o meio ambiente, alta seletividade, estabilidade a variações de temperatura e pH e podem ser sintetizados a partir de fontes renováveis (Besai & Banat, 1997).

Embora os biossurfactantes sejam amplamente utilizados, a sua função fisiológica ainda não é bem elucidada. Algumas funções foram atribuídas a estas moléculas, como por exemplo, a emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos em meio aquoso para facilitar o crescimento destes microorganismos (Cooper, *et al.*, 1981), estão também associadas a motilidade e algumas espécies como o raminolipídio produzido pela *P. aeruginosa* possuem atividade antibiótica (Lin, 1996).

A *P. aeruginosa* é uma espécie bacteriana Gram-negativa, que pertence à classe das proteobacterias. Está presente em um vasto número de nichos ecológicos, sendo capaz de utilizar diversos compostos para obtenção de nutrientes (Soberón-Chavez, capítulo). Apresenta diversas aplicações biotecnológicas, como a capacidade de degradar alcanos de cadeia ramificada, são excelentes produtoras de biossurfactantes (raminolipídeos), que apresentam diversas aplicações industriais e também são produtoras de polihidroxialcanoato (PHA), um polímero de ácido graxo, que pode ser usado para produção de plásticos biodegradáveis (Soberón-Chavez *et al.*, 2005).

Os raminolipídeos são compostos biossurfactantes de origem microbiana produzidos principalmente por bactérias sob crescimento aeróbio e em meio aquoso, onde são secretados. A fonte de carbono utilizada na biossíntese dos biossurfactantes pode provir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e graxas ou suas misturas (Bagnolo, 1999). Os raminolipídeos oriundos de *P. Aeruginosa* tem sido um grupo de biossurfactantes estudados extensivamente (Hitsatsuka *et al.*, 1971; Guerra-Santos *et al.*, 1984). Até o momento, sete homólogos foram identificados, apresentando um tensão superficial de 29 mN/m. A *P. aeruginosa* pode produzir raminolipídeos a partir de diversos substratos como alcanos C<sub>11</sub> e C<sub>12</sub>, piruvato, citrato, frutose, glicerol, óleo verde-oliva, glicose e o manitol (Robert *et al.*, 1989). O rendimento de produção e a composição desses raminolipídeos dependem das condições de crescimento, como pH, temperatura e composição do meio (Mulligan & Gibbs, 1989).

Uma outra cepa também conhecida é a *Burkholderia kururiensis*, uma bactéria não patogênica de vida livre. Esta bactéria foi isolada de ambientes aquíferos poluídos com tricloroetileno no Japão (Zang *et al.*, 2000). Em 2001, foi revelada a sua capacidade de fixar nitrogênio a partir de condições de baixa aeração, características ainda não detectadas em outras espécies de *Burkholderia* (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001). Esta bactéria diazotrófica endofítica foi semelhantemente isolada de cultivares de arroz inundado (Rodrigues, 2003) e apresenta uma discreta produção de raminolipídeos.

Estudos relatam que dentro do gênero *Burkholderia* há produção de raminolipídeos, como em *Burkholderia pseudomallei*, além de *Burkholderia cenocepacia* que produz outro tipo de biossurfactante, o lipopeptídeo. Ensaios preliminares apontam a presença do gene *rhlA* no genoma de *Burkholderia kururiensis*, além de evidenciar através de espectrometria de massas a presença de um biossurfactante distinto do produzido por *Pseudomonas aeruginosa*.

Em 1995, Withold *et al.* 1995, desenvolveu um trabalho relatando a possibilidade da utilização de hospedeiros heterólogos para a produção de raminolipídeos. Neste estudo foi constatada a produção de raminolipídeos em diversos hospedeiros, como *Escherichia coli*, mostrando desta forma que a utilização de hospedeiros heterólogos é viável e proporciona assim a utilização de células seguras para a aplicação industrial (Withold *et al.*, 1995).

Paralelamente, estudos envolvendo o emprego de hospedeiros heterólogos não-patogênicos para a expressão dos genes de *P. aeruginosa* envolvidos na biossíntese de raminolipídeos geraram uma cepa bacteriana superprodutora de raminolipídeos, a *B. kururiensis* LMM21. Nesta cepa há a expressão dos genes *rhlA* e *rhlB* da *P. aeruginosa* em *B. kururiensis*. O que representa um importante objeto de trabalho envolvendo engenharia metabólica para o aumento da produção de raminolipídeos. Esta nova linhagem foi capaz de produzir até 600% a mais de raminolipídeos quando comparada à *B. kururiensis* (Neves *et al.*, 2012).

## 2.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS RAMINOLIPÍDEOS

### 2.4.1. FÍSICO-QUÍMICA

Em um líquido, cada molécula se movimenta sob a influência das moléculas ao redor dela. Sendo que dentro de um líquido temos as moléculas totalmente cercadas, que é atraída por todos os lados, enquanto que na superfície as moléculas não estão completamente cercadas, sofrendo atração somente nas laterais e abaixo delas. Portanto, para a molécula ir até a superfície, esta deve possuir uma energia maior do que a de atração, esta energia potencial deve aumentar, ou seja, realizar trabalho para chegar até a superfície. Assim, para aumentar a superfície de um líquido requer um gasto de energia, e essa quantidade de energia requerida é a tensão superficial (Brady, capítulo 8).

Portanto, a magnitude da tensão superficial de um líquido depende das forças de atração entre as moléculas. Logo, quando as forças de atração são grandes a tensão superficial é alta. A tensão superficial também é influenciada pela temperatura, uma vez que é aumentada a energia cinética das moléculas, as forças de atração intermoleculares diminuem, reduzindo também a tensão superficial (Figura 6).

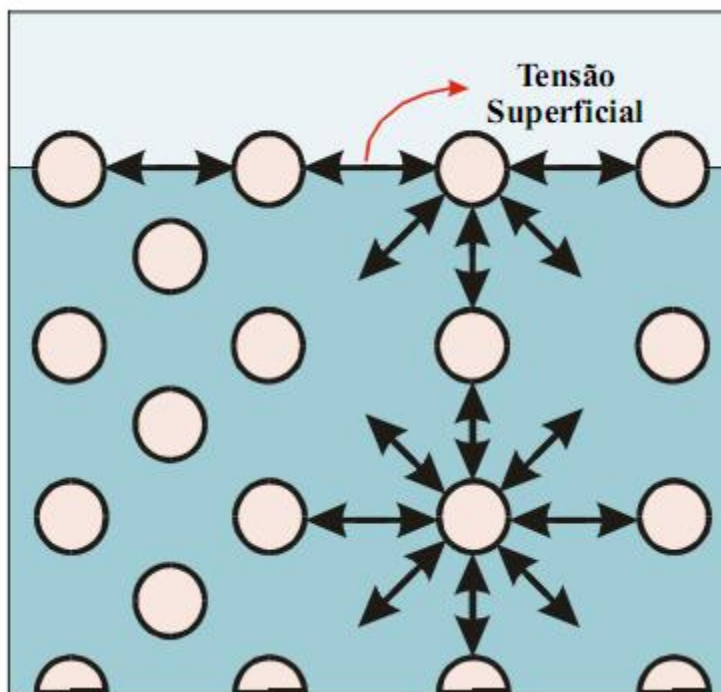


Figura 6. Interações das moléculas na superfície e no interior de um líquido.

Quando temos uma interface formada por duas fases que é constituída por grupos hidrofílicos e hidrofóbicos há uma diferença na tensão interfacial entre estes líquidos. Assim

quando os surfactantes são adicionados, por eles possuírem um ou mais domínios hidrofílico e hidrofóbico, estes se distribuem nas interfaces formando um filme molecular reduzindo as tensões superficiais e/ou interfaciais da mistura, que é uma propriedade única dos surfactantes. Ao se acumularem entre estes meios, a medida que a concentração de surfactantes aumenta, há a formação de micelas. As micelas são definidas como agregados moleculares que facilitam a dissociação e a dinâmica de soluções imiscíveis. A concentração necessária para a formação destas estruturas é chamada de concentração micelar crítica (CMC)(Figura 7).

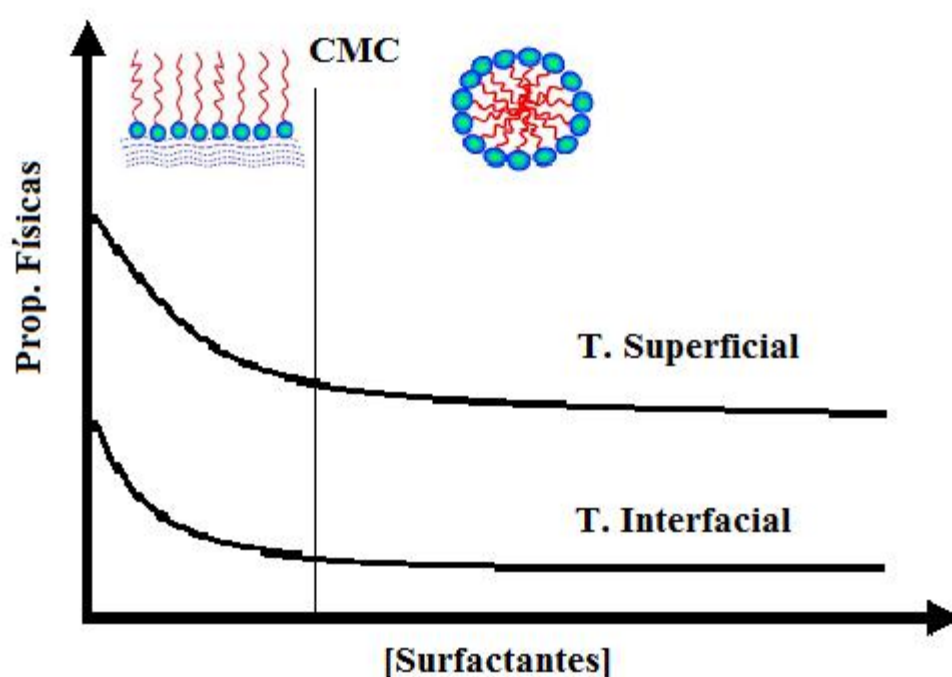


Figura 7. Gráfico representativo da redução da tensão superficial e interfacial em relação ao aumento da concentração de surfactantes.

#### 2.4.2. ESTRUTURAL

##### 2.4.2.1. CROMATOGRAFIA

A utilização de técnicas de cromatografia tem sido bastante usual para separação de uma mistura de raminolipídeos. Quando esta técnica está associada há um método de detecção apropriado como espectrometria de massas (*MS*), pode revelar a grande variedade de tamanhos de cadeias dos bio surfactantes.

#### 2.4.2.1.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia de camada delgada é utilizada extensivamente para determinar a composição de extratos brutos de raminolipídeos obtidos a partir de meios de cultivo, e para sua purificação preliminar (Rendell *et al.*, 1990). Para a separação de diferentes espécies de raminolipídeos podem ser aplicados tanto a cromatografia de fase normal como a reversa. Normalmente, para a separação de glicolipídeos, são utilizadas misturas de solventes envolvendo clorofórmio e metanol, com adição de pequenas partes de ácido para otimizar a migração (Hubert *et al.*, 2012).

#### 2.4.2.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Sabe-se que métodos de *HPLC* foram desenvolvidos para quantificar as espécies de raminolipídeos em uma mistura de biossurfactantes bacterianos. Em um destes trabalhos, foram identificadas misturas de biossurfactantes contendo principalmente ácido decanóico, dodecanóico e uma variedade de compostos desidrogenados isolados de *P. aeruginosa* UG2 cultivadas em óleo de milho como única fonte de carbono. Neste trabalho, as espécies raminolipídeos foram identificados e quantificados após a sua derivatização para os ésteres correspondentes (Mata-Sandoval *et al.*, 1999). Para confirmar a confiabilidade do método de HPLC, as misturas biossurfactantes e as espécies isoladas devem ainda ser analisadas por espectrometria de massas. Ainda há uma necessidade de desenvolver um tipo de análise preciso para misturas de raminolipídeos, pois a composição de uma mistura de raminolipídeos influencia no desempenho como um portador de contaminantes e na sua capacidade para melhorar a biodisponibilidade de contaminantes (Mata-Sandoval *et al.*, 1999). Análises tradicionais de raminolipídeos, tais como, os ensaios de turbidez ou colorimétricos (Van Dyke *et al.*, 1993) não fornecem informações sobre a composição da mistura. Ensaios envolvendo cromatografia líquida de alta performance é o método mais desenvolvido e eficiente para determinação de misturas raminolipídeos, estando porém, limitados a quantificação das espécies.

#### 2.4.2.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A radiação infravermelha corresponde a região do espectro eletromagnético situada entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ , nas regiões entre o visível e as microondas. O espectro de

infravermelho de cada molécula é característico, porém certos grupos funcionais dão origem a bandas que ocorrem na mesma frequência de vibração independente da estrutura da molécula.

A energia no infravermelho quando é absorvida pela molécula é convertida em energia de vibração molecular. As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações angulares ou axiais, além de possuírem interações de acoplamento simétricos ou assimétricos.

A utilização de espectroscopia de infravermelho para análises de biossurfactantes é válida para análises qualitativas, como por exemplo, identificação dos grupos funcionais, porém a utilização da radiação infravermelha possui limitações consideráveis, quando sua utilização tem como foco a quantificação de raminolipídeos, uma vez que podemos ter interferentes na análise e na amostragem (Silverstein, capítulo).

#### 2.4.2.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que nos permite saber a massa molecular de uma determinada molécula através da sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Nesta técnica as moléculas são ionizadas, separadas e então detectadas (Figura 8), Esta análise é feita em um sistema sob baixa pressão.

Um espectrômetro de massas pode ser entendido, via de regra, como um instrumento contendo uma fonte de íons, um separador ou filtro de massas e um detector. Embora existam várias estratégias para separação e detecção, a ionização é aquela que possui o maior número de diferentes métodos. Isso deve-se à grande variedade de tipos de amostras e espécies de interesse (Moraes *et al*, 2003).

Através da espectrometria de massas é possível determinar:

- A composição elementar de amostras;
- A estrutura molecular;
- A composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas;
- A estrutura e a composição de superfícies sólidas e
- As proporções isobáricas de átomos em amostras.

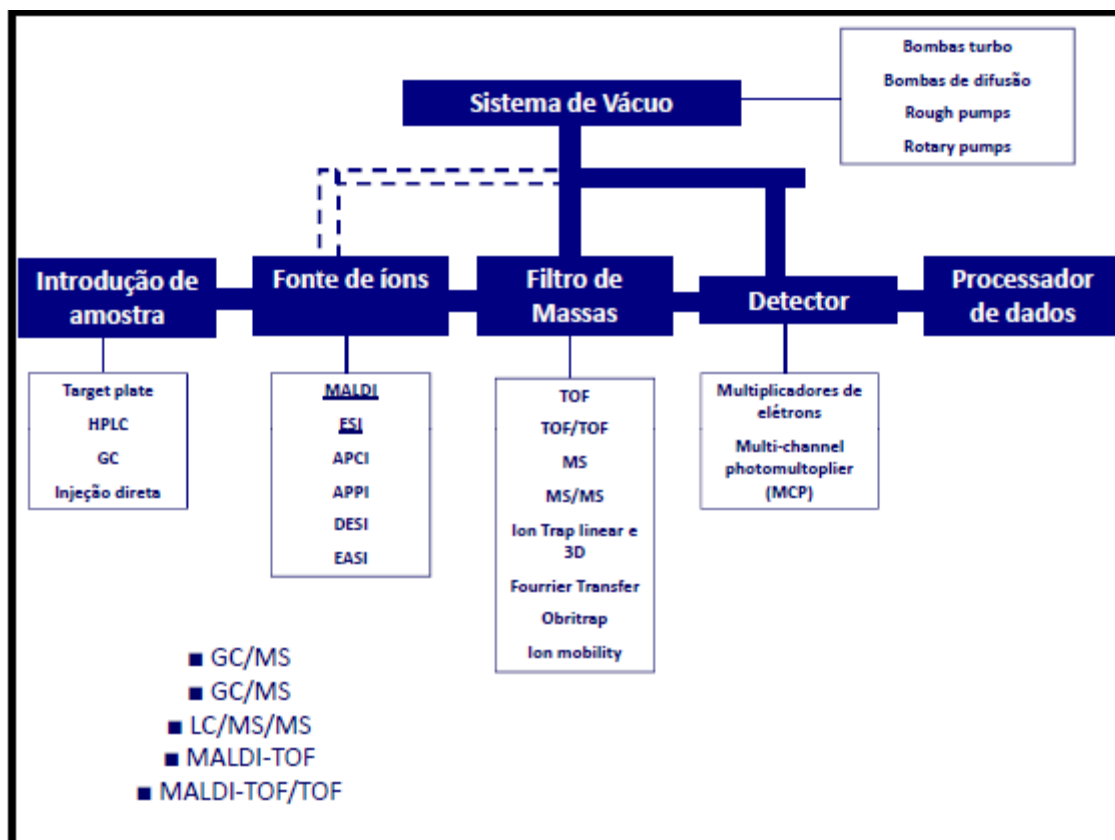


Figura 8. Esquema geral de funcionamento do Espectrometro de Massas. Adaptado de Ferreira, 2010.

#### 2.4.2.3.1. Fonte de Íons

Para fazer a análise das moléculas é necessário que esta possua carga, então a ionização ocorre para gerar espécies carregadas positiva ou negativamente através de transferência de energia. Pode-se dizer que a efetiva ionização (transformação de uma espécie neutra em um íon) é um efeito secundário. Como fontes de ionização atualmente existentes e mais utilizados temos:

- ESI (Ionização por Electrospray)
- APCI (Ionização Química a Pressão Atmosférica)
- APPI (Fotoionização a Pressão Atmosférica)
- DESI (Dessorção po Electrospray)
- MALDI (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz)
- EI (Ionização por Elétrons)

### Electrospray (ESI)

Esta técnica de ionização consiste em expor a amostra (solubilizada em um líquido condutor) a um campo elétrico, assim a amostra começa a mudar a sua forma superficial e ao aumentar a tensão elétrica da gota começa a tomar forma de tensão superficial de um cone, conforme há um acúmulo de cargas inicia-se a formação de um aerossol devido as repulsões eletrostáticas (Figura 9).

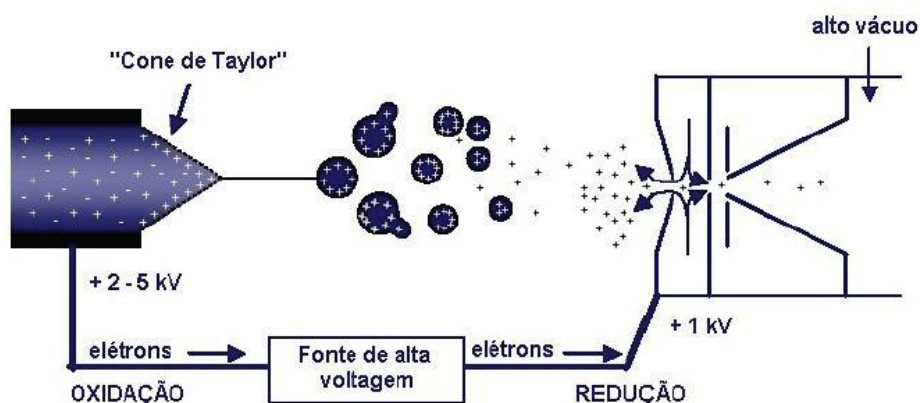


Figura 9. Ionização por Electrospray. Ferreira, 2010.

### Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI)

A Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) (Figura 10) é uma técnica que utiliza reações íon-molécula em fase gasosa sob pressão atmosférica com finalidade de ionizar o analito. É um método onde os íons primários são produzidos por descarga corona em um spray do solvente. APCI é aplicado tanto para compostos polares como para compostos de baixa polaridade com peso molecular de até 1500 Da e produz íons geralmente monocarregados. Normalmente esta técnica não é útil para análise de compostos termicamente lábeis.



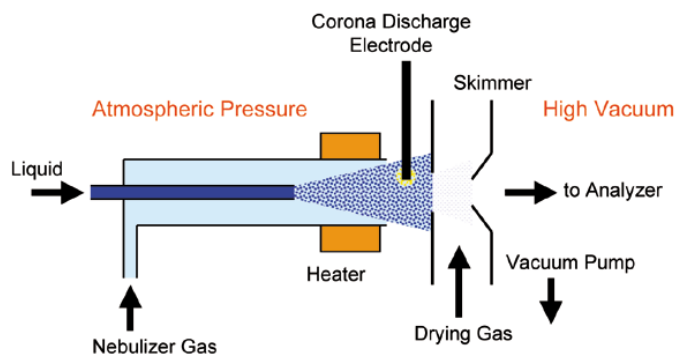


Figura 10. Esquema de Ionização Química a Pressão Atmosférica.

### Fotoionização a Pressão Atmosférica (APPI)

A fonte de APPI é semelhante à de APCI, consistindo de um nebulizador aquecido para dispersar e dessolvatar o eluente aos poucos, e de uma lâmpada VUV (Ultra Violeta ao vácuo), a qual irá induzir a ionização, no lugar da agulha que é usada em APCI (Figura 11). Existem duas fontes de APPI disponíveis atualmente. A primeira versão da fonte APPI, aumenta as reações íon-moleculares auxiliadas por dopante. O jato de solvente no nebulizador aquecido é irradiado pela lâmpada UV e introduzido no amostrador linearmente. O segundo equipamento disponível é ainda mais semelhante à fonte de APCI, pois é uma fonte aberta ortogonal com a lâmpada VUV localizada onde uma agulha corona está posicionada na fonte APCI. Esta fonte é para aumentar o uso direto de APPI sem necessidade do uso de dopante. Este fato deve-se à ocorrência da ionização na câmara de nebulização, local onde há menos probabilidade de interações do tipo íon-dopante. Esta fonte de ionização é comumente aplicada a compostos não polares e como esta técnica aplica energia de ionização baixa (10,0 a 10,6 eV) normalmente há pouca ou nenhuma fragmentação do analito.

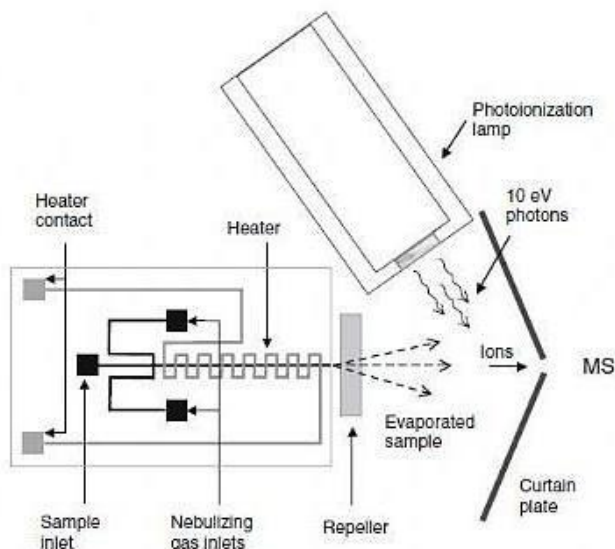


Figura 11. Esquema de Fotoionização a Pressão Atmosférica

Fonte: [www.espectometriademassas.com.br](http://www.espectometriademassas.com.br)

### Electrospray por dessorção (DESI)

O DESI exige a otimização de experimental de variáveis como composição solvente, ângulo de incidência e distâncias da dessorção entre outros parâmetros para cada tipo de analito. No caso de DESI, os íons são produzidos dirigindo gotículas solventes carregadas de uma fonte de ESI ou ESSI para a amostra. Os analitos na superfície são dessorvidos e ionizados (Figura 12). DESI é uma das técnicas que pode ser usado tanto para analisar biomoléculas maiores quanto para explorar a química reativa de pequenas moléculas.

O mecanismo de ionização consiste em um processo onde gotículas aquosas com diâmetros menores que 10  $\mu\text{m}$  incidem na superfície da amostra com velocidade superior a 100 m/s. O tempo  $t$  é dado enquanto as gotículas começam a se mover para a superfície e em algumas etapas as gotas muito maiores são separadas do líquido com velocidades mais baixas.

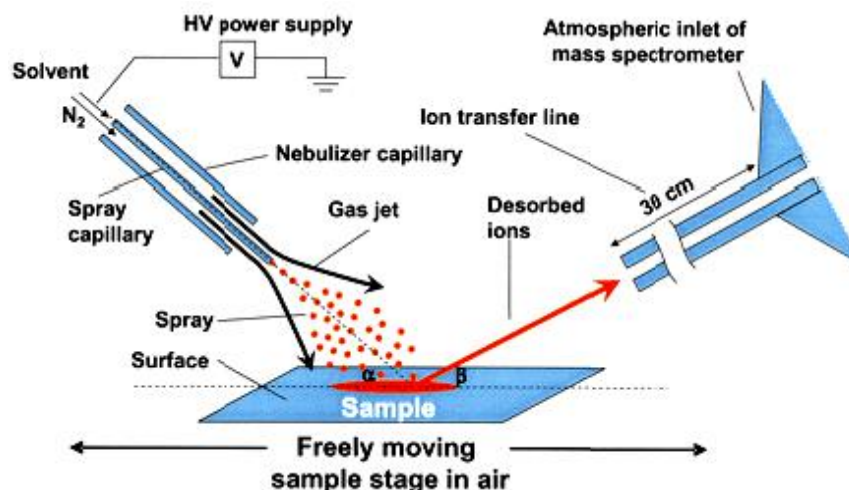


Figura 12. Esquema de ionização por DESI.

Fonte: [http://www.uel.br/eventos/semanadaquimica/2010/arquivos/minicurso/outras\\_fontes\\_ionizacao.pdf](http://www.uel.br/eventos/semanadaquimica/2010/arquivos/minicurso/outras_fontes_ionizacao.pdf)

### Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI)

Este é um processo de ionização branda, sendo apropriado para biomoléculas com elevada massa molecular. Esta técnica é bastante utilizada para fazer análise proteômica. O MALDI consiste em colocar a amostra em uma matriz química, que facilita a produção de íons gasosos a partir de compostos pesados. Assim um feixe de laser (ultravioleta ou infravermelho pulsado) serve como fonte de dessorção e ionização. A matriz então absorve a energia do laser, induzindo a vaporização de parte da amostra (Figura 13). Assim que a vaporização ocorre, as moléculas são transferidas eletrostaticamente para o espectrômetro de massas, onde são individualmente detectadas.

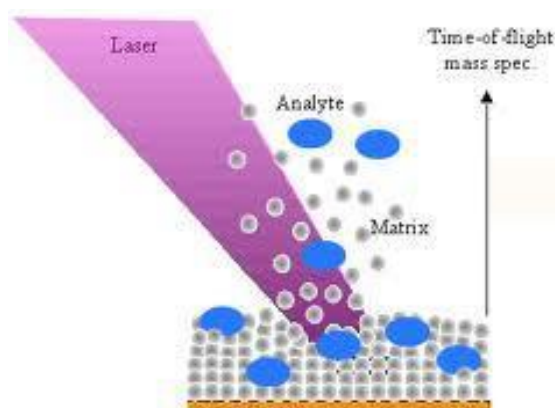


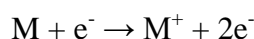
Figura 13. Ionização por MALDI.

Fonte: <http://cbm.cnrs-orleans.fr/spip.php?rubrique92&lang=fr>

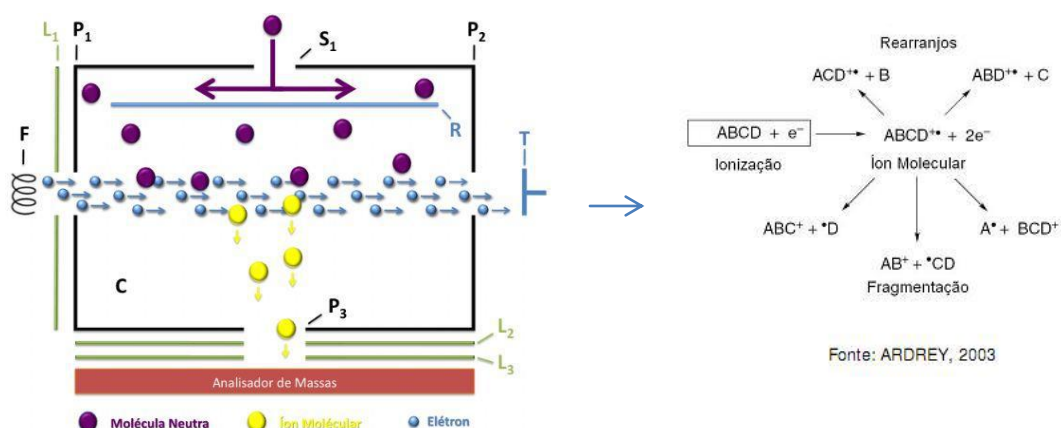
### Ionização por Elétrons (EI)

A técnica de ionização por elétrons é uma das maneiras mais eficientes e antigas de transformar moléculas neutras em íons, feita por colisão com elétrons. Como pré-requisito básico, todos os analitos devem estar na sua forma de vapor, e portanto, as amostras devem ser voláteis, o que acaba sendo uma limitação da técnica.

A equação abaixo demonstra o princípio fundamental desta ionização. Um elétron é fornecido pela fonte de ionização e este se aproxima de um dos elétrons que está na órbita de uma molécula, ao se aproximarem estes se repelem e o elétron da molécula é expelido gerando um íon com carga positiva.



A fonte é composta basicamente por um cubo com alguns orifícios para a passagem dos íons formados e dos elétrons. Um feixe de elétrons atravessa a câmara de ionização (Figura 14). Na ionização por EI um feixe de elétrons de 70 eV é produzido por um filamento. Os elétrons são então acelerados por um ânodo, e acabam interagindo e energizando as moléculas do analito na fase gasosa. Como consequência desta energização, cerca de 20 eV são transferidos para as moléculas. Então há a produção de um íon. Os 70 eV são necessários para que a energia dos elétrons apresentem comprimento de onda similar à energia das ligações em moléculas orgânicas (~0,14 nm), assim a transferência de energia é maximizada. Contudo, esta ionização gera íons com estado energético excedente, este processo de ionização é seguido por sucessivas clivagens e rearranjos moleculares.



Fonte: <http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=4&codassunto=45&numero=6>

#### 2.4.2.3.2. Analisador de Massas

Os espectrômetros de massa podem ser classificados em várias categorias dependendo da natureza do analisador de massa. Como filtros (ou analisador) de massas os mais utilizados são o Tempo-de-vôo (TOF) e o Quadrupolo. A função do analisador de massa é separar tais íons de acordo com a sua relação massa-carga ( $m/z$ ).

O limite de massa, a transmissão iônica e o poder de resolução em massa são características principais de um analisador de massas. O limite de massa significa o valor mais alto de massa que pode ser medido é geralmente expresso em daltons (Da) para um íon de carga unitária, isto é,  $z = 1$ . A transmissão é a razão entre o número de íons que chegam ao detector e os íons produzidos na fonte. O poder de resolução é a capacidade de produzir dois sinais distintos para dois íons com uma diferença de massa pequena; pode ser quantificado por  $R = m/Dm$ , onde  $Dm$  é a menor diferença de massa capaz de ser resolvida, ou ainda,  $Dm$  é a largura de um pico à meia altura.

##### Tempo de Vôo (TOF)

Os analisadores de massa por tempo de vôo foram descritos por Wiley e McLaren em 1955. Eles conseguiram reunir os requisitos de focalização espacial e de energia dos íons, tornando viável o primeiro instrumento comercial TOF-MS.

A filosofia de trabalho de um TOF (Figura 15) consiste na análise e identificação de íons através da medida do intervalo de tempo gasto para percorrerem a distância do ponto de sua geração até um detector. Todos os íons recebem o mesmo acréscimo de energia cinética durante uma aceleração rápida (na faixa de 0.1 a 1 ms), mas como eles têm diferentes valores de  $m/z$  são progressivamente separados em grupos de acordo com a sua velocidade (e portanto segundo a quantidade  $m/z$ ) a medida que atravessam a região livre de campo entre a fonte de íons e o detector. Os íons batem sequencialmente no detector em ordem de valor crescente de  $m/z$ , produzindo pulsos elétricos.

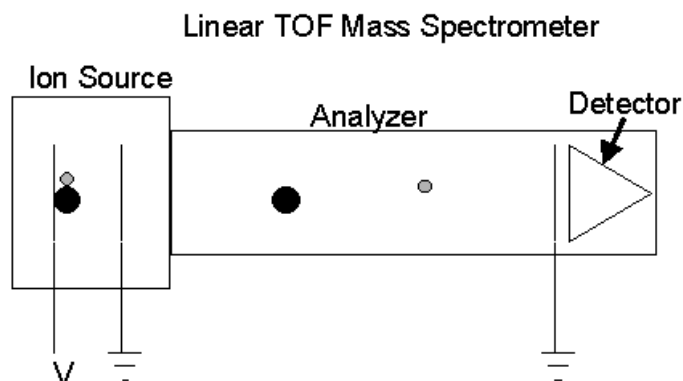


Figura 15. Analisador de massas por tempo-de-vôo.  
 Fonte: [http://msr.dom.wustl.edu/Research/MALDI\\_TOF\\_Mass\\_Spec\\_and\\_Proteomics/Time-of-Flight\\_Mass\\_Spectrometry\\_Fundamentals.htm](http://msr.dom.wustl.edu/Research/MALDI_TOF_Mass_Spec_and_Proteomics/Time-of-Flight_Mass_Spectrometry_Fundamentals.htm)

Os íons são acelerados por um pulso de energia com potencial (V) antes de voar por uma distância definida (d). O cálculo é realizado medindo-se o tempo de deslocamento (t) dos íons até o detector. O tempo de deslocamento é proporcional a massa dos íons.

Assim a molécula com massa (m) e carga igual a  $q=ze$  tem como energia cinética

$$E_K = \frac{mv^2}{2} = qV = zeV$$

O tempo necessário é  $t = d/v$ , portanto substituindo o valor da velocidade encontrado na equação anterior temos que  $t^2 = m/z (d^2/2Ve)$ , onde podemos ver que a relação  $m/z$  é proporcional ao quadrado do tempo. Logo temos,

$$t = k \sqrt{\frac{m}{q}}$$

### Quadrupolo

O Quadrupolo (Figura 16) é um tipo de analisador de massas mais utilizado em espectrometria de massas. Os íons são separados de acordo com a estabilidade de sua trajetória em um campo elétrico, que é criado através de oscilações elétricas aplicadas nos cilindros metálicos. Enquanto viajam na direção z os íons também oscilam no plano x-y, devido ao potencial aplicado aos cilindros.

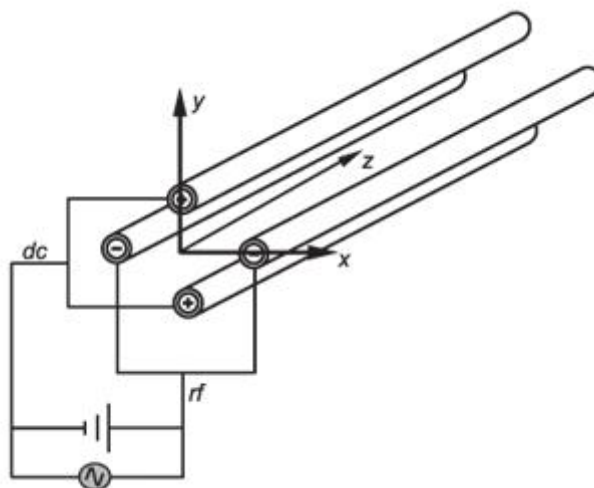


Figura 16. Analisador de massas tipo quadrupolo

Fonte: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422008000300030](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000300030)

Nestes dois cilindros opostos há um potencial de  $+(U + V\cos(wt))$  enquanto nos outros dois há um potencial de  $-(U + V\cos(wt))$ , onde  $U$  = potencial fixo,  $V\cos(wt)$  = potencial RF aplicado a uma determinada amplitude ( $V$ ) e frequência ( $w$ ). Portanto, ao aplicar os potenciais em pares opostos os cilindros variam senoidalmente e os íons são capazes de atravessar a região central ao longo do eixo. Essas combinações de potenciais e frequência resultam em íons específicos com trajetórias estáveis ao longo do quadrupolo até chegar ao detector, assim todos os outros íons com  $m/z$  diferentes irão ter suas trajetórias instabilizadas, não chegando ao detector.

### Orbitrap

Em um orbitrap, os íons são injetados tangencialmente no campo elétrico entre os eletrodos e presos porque a sua atração eletrostática para o eletrodo interno é equilibrada pela força centrífuga. Assim, os íons giram em torno do eletrodo central em anéis. Além disso, os íons também movem-se para trás e para frente ao longo do eixo do eletrodo central. Portanto, os íons de uma determinada razão massa-carga ( $m/z$ ) se deslocam em anéis, que por sua vez oscilam ao longo do eixo central. A frequência destas oscilações harmônicas é independente da velocidade do íon e é inversamente proporcional à raiz quadrada da razão massa/carga ( $m/z$  ou  $m/q$ ).

$$\omega = \sqrt{\left(\frac{z}{m}\right)} \cdot k$$

Ao sentir a oscilação de íons de uma forma semelhante à utilizada na FTICR-MS, a armadilha pode ser usada como um analisador de massas. Orbitraps tem uma precisão muito alta (1-2 ppm), uma resolução de alta potência (até 200,000) e um alto *range* dinâmico (cerca de 5000) (Makarov, 2006). A Figura 17 ilustra a órbita dos íons ao redor do eletrodo.

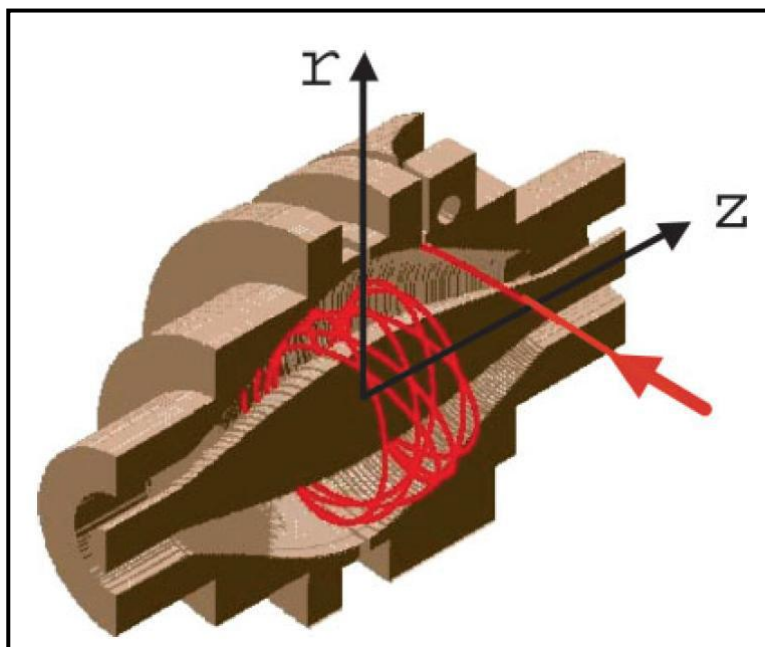


Figura 17: Funcionamento esquematizado do Orbitrap (Marshall & Hendrickson, 2008).

Na tabela abaixo (Tabela 3) temos as estruturas químicas de diferentes tipos de raminolipídeos identificados por espectrometria de massas - HPLC/MS.



Tabela 3. Estruturas químicas de diferentes tipos raminolípídeos. Extraído de Déziel, et. al.,2010.

No.	Symbol	M. Form.	MW	R <sub>1</sub>	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	R <sub>2</sub>	Structure	
Mono-rhamno-mono-lipidic congeners									
1	Rha-C <sub>8,2</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	302.32	H	1(-4H)	-	H		
2	Rha-C <sub>8</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	306.35	H	1	-	H		
3	Rha-C <sub>10</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>	334.41	H	3	-	H		
4	Rha-C <sub>12,2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>	358.43	H	5(-4H)	-	H		
5	Rha-C <sub>12</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	362.46	H	5	-	H		
6	Rha-C <sub>14,2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	386.48	H	7(-4H)	-	H		
Mono-rhamno-di-lipidic congeners									
7	Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	448.55	H	1	1	H	  b: α-decenoyl group	
8	Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10,1</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	474.58	H	1	3(-2H)	H		
9	Rha-C <sub>10,1</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	474.58	H	3(-2H)	1	H		
10	Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	476.60	H	1	3	H		
11	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	476.60	H	3	1	H		
12	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10,1</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> O <sub>9</sub>	502.64	H	3	3(-2H)	H		
13	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>	504.65	H	3	3	H		
14	Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>12</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>	504.65	H	1	5	H		
15	Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>	504.65	H	5	1	H		
16	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12,1</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	530.69	H	3	5(-2H)	H		
17	Rha-C <sub>12,1</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	530.69	H	5(-2H)	3	H		
18	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> O <sub>9</sub>	532.71	H	3	5	H		
19	Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> O <sub>9</sub>	532.71	H	5	3	H		
20	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>14,1</sub> <sup>a</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>9</sub>	558.74	H	3	7(-2H)	H		
21	Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>12,1</sub> <sup>a</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>9</sub>	558.74	H	5	5(-2H)	H		
22	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>14</sub> <sup>a</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>56</sub> O <sub>9</sub>	560.76	H	3	7	H		
23	Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>56</sub> O <sub>9</sub>	560.76	H	5	5	H		
24	Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>60</sub> O <sub>9</sub>	588.81	H	5	7	H		
25	Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>64</sub> O <sub>9</sub>	616.87	H	7	7	H		
26	Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>16</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>68</sub> O <sub>9</sub>	644.92	H	7	9	H		
27	Rha-C <sub>16</sub> -C <sub>16</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> O <sub>9</sub>	672.97	H	9	9	H		
28	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> -CH <sub>3</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	518.68	H	3	3	CH <sub>3</sub>		
29	Decenoyl-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>64</sub> O <sub>10</sub>	656.89	b	3	3	H		
Di-rhamno-mono-lipidic congeners									
30	Rha-Rha-C <sub>8</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	452.49	H	1	-	H		
31	Rha-Rha-C <sub>10</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>	480.55	H	3	-	H		
32	Rha-Rha-C <sub>12,1</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>11</sub>	506.58	H	5(-2H)	-	H		
33	Rha-Rha-C <sub>12</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>11</sub>	508.60	H	5	-	H		
34	Rha-Rha-C <sub>14</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>11</sub>	536.65	H	7	-	H	  d	
Di-rhamno-di-lipidic congeners									
35	Rha-Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>13</sub>	594.69	H	1	1	H		
36	Rha-Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>13</sub>	622.74	H	1	3	H		
37	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>13</sub>	622.74	H	3	1	H		
38	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10,1</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub> O <sub>13</sub>	648.78	H	3	3(-2H)	H		
39	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>13</sub>	650.79	H	3	3	H		
40	Rha-Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>12,1</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub> O <sub>13</sub>	648.78	H	1	5(-2H)	H		
41	Rha-Rha-C <sub>12,1</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub> O <sub>13</sub>	648.78	H	5(-2H)	1	H		
42	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12,1</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>60</sub> O <sub>13</sub>	676.83	H	3	5(-2H)	H		
43	Rha-Rha-C <sub>12,1</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>60</sub> O <sub>13</sub>	676.83	H	5(-2H)	3	H		
44	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>	678.84	H	3	5	H		
45	Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>	678.84	H	5	3	H		
46	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>14,1</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>64</sub> O <sub>13</sub>	704.89	H	3	7(-2H)	H		
47	Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>12,1</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>64</sub> O <sub>13</sub>	704.89	H	5	5(-2H)	H		
48	Rha-Rha-C <sub>12,1</sub> -C <sub>12</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>64</sub> O <sub>13</sub>	704.89	H	5(-2H)	5	H		
49	Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>66</sub> O <sub>13</sub>	706.90	H	5	5	H		
50	Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub>	734.95	H	5	7	H		
51	Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub>	734.95	H	7	5	H		
52	Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	C <sub>40</sub> H <sub>74</sub> O <sub>13</sub>	763.00	H	7	7	H		
53	Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>16</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>78</sub> O <sub>13</sub>	791.06	H	7	9	H		
54	Rha-Rha-C <sub>16</sub> -C <sub>16</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>78</sub> O <sub>13</sub>	791.06	H	9	7	H		
55	Rha-Rha-C <sub>16</sub> -C <sub>16</sub>	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> O <sub>13</sub>	819.11	H	9	9	H		
56	Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub> <sup>(B)</sup>	C <sub>54</sub> H <sub>100</sub> O <sub>15</sub>	989.36	Structure drawn separately <sup>(B)</sup>					
57	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> -CH <sub>3</sub>	C <sub>33</sub> H <sub>60</sub> O <sub>13</sub>	664.82	H	3	3	CH <sub>3</sub>		
58	Decenoyl-Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub>	803.03	b	3	3	H		

### 3. OBJETIVOS

Caracterização por análise estrutural e físico-química das moléculas de biossurfactantes glicolipídicos produzidos pela cepa bacteriana recombinante, *Burkholderia kururiensis* LMM21 obtida pelo nosso grupo.

## 4. EXPERIMENTAL

### 4.1. CULTIVO E PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

#### 4.1.1. BACTÉRIA E PLASMÍDEOS EMPREGADOS

A cepa geneticamente modificada *B. kururiensis* LMM21 (contendo os genes *rhlA* e *rhlB* de *P. aeruginosa* PAO1, envolvidos na síntese de mono-raminolipídeos) e a cepa controle, produtora de raminolipídeos, de onde foram obtidos os genes para a manipulação genética, *P. aeruginosa* PAO1, foram mantidas em meio Luria Bertani (LB) suplementado com 20% (v/v) glicerol e armazenadas a -80°C (Tabela 4).

Tabela 4. Cepas bacterianas empregadas neste estudo.

Bactérias/Plasmídeos	Descrição	Origem ou referência
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Selvagem, cepa genômica	Holloway <i>et al.</i> , 1979; Stover <i>et al.</i> , 2000
<i>B. kururiensis</i> KP23 <sup>T</sup>	Selvagem, isolada de ambiente aquífero no Japão	Zhang <i>et al.</i> , 2000
LMM21	<i>B. kururiensis</i> KP23 <sup>T</sup> contendo o plasmídeo pLMM12 (com genes <i>rhlA</i> e <i>rhlB</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	(de Lima, 2012)

#### 4.1.2. MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para a produção dos biossurfactantes, as bactérias foram reativadas “overnight” em meio LB líquido, a 28°C, 170 rpm, a partir do estoque armazenado em freezer -80°C. Após a reativação, 1,0 mL da suspensão de células foram inoculadas em frascos erlenmeyer de 1L contendo 300 mL de meio salino de pré-inóculo (MSPI) (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,0 g/L, NaNO<sub>3</sub> 1,0 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g/L, Glicerol 30,0 g/L, Extrato de levedura 5,0 g/L,

Peptona bacteriana 5,0 g/L) (Santos *et al*, 2002) e incubado a 28°C, 170 rpm por 40 horas. As células foram então concentradas por centrifugação a 6.000 rpm, por 25 minutos e então inoculadas em frascos erlenmeyers contendo 500 mL de meio salino de produção (MSP) ( $K_2HPO_4$  7,0 g/L,  $KH_2PO_4$  3,0 g/L,  $NaNO_3$  1,4 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g/L, Glicerol 30,0 g/L) (Santos *et al.*, 2002) a uma concentração final de células de 1,0 g/L. O cultivo foi conduzido a 28°C e 170 rpm. Para os testes comparativos entre as cepas, o cultivo foi conduzido por 120 horas. Além do glicerol, foram testados como fontes de carbono n-hexadecano e óleo de oliva, em concentração final de 12,5g/L.

#### 4.1.3. DIVERSIFICAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

A investigação envolvendo a utilização de diferentes fontes de carbono para a produção de biossurfactantes foi conduzida a partir das cepas selecionadas nos dois screenings. Foram testadas inicialmente, para a cepa *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>, 13 diferentes fontes de carbono, em concentração de 2,0% (m/v): glicerol; óleo de oliva; óleo de soja; óleo de canola; óleo de milho; óleo de girassol; óleo de babaçu; n-hexadecano; óleo mineral; óleo de motor; biodiesel metílico de soja; glicerina loira e óleo diesel. A relação C/N (proporção de carbono e nitrogênio disponíveis para consumo microbiano otimizado pelo grupo) em 71, resultando em diferentes concentrações dos substratos acima citados. Testes com a recombinante LMM21, envolvendo diferentes fontes de carbono, foram conduzidos por 240 horas.

#### 4.2. EXTRAÇÃO

Todas as metodologias de extração foram testadas a partir dos sobrenadantes livres de célula obtidos após 240 horas de cultivo da cepa *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> em meio MSP, suplementado com glicerol, uma vez que foi observada menor concentração de contaminantes na amostra em comparação a outros meios que resultaram em um bom rendimento.

Algumas metodologias foram testadas, baseadas na revisão escrita por Howe e colaboradores (2008):

*Extração direta com acetato de etila* (Sarubbo *et al.*, 2008): Nesta metodologia simples, o sobrenadante foi diretamente extraído com este solvente, em proporção 1:3

(Sobrenadante:Solvente), sendo a fração orgânica posteriormente seca em rotaevaporador (Heto Drywinner) e o extrato armazenado para posteriores análises.

*Purificação por cartucho de extração em fase sólida (SPE):* Nesta metodologia, o surfactante é diretamente extraído a partir do sobrenadante em coluna contendo um cartucho com resina C18. Após retenção do material no cartucho, o mesmo é eluído com clorofórmio:metanol (2:1) para a recuperação dos biossurfactantes.

*Extração com acetato de etila do sobrenadante acidificado* (Dubeau *et al.*, 2009): O sobrenadante foi acidificado a pH 3,5 com HCl 6N, e foi realizada, então, uma extração direta com acetato de etila (1:3; sobrenadante:acetato de etila). A fase orgânica foi, então, separada, desidratada com sulfato de sódio anidro e concentrada em rotaevaporador (Heto Drywinner), para a recuperação do solvente. O produto resultante foi, então, recuperado do balão de secagem com metanol, seco em atmosfera de nitrogênio e armazenado a -20°C. Este método foi utilizado para a etapa final de caracterização por espectrometria de massas.

#### 4.3. QUANTIFICAÇÃO DOS GLICOLIPÍDEOS

Considerando que os biossurfactantes secretados são raminolipídeos, a quantificação de glicolipídeos extracelulares foi feita pela quantificação da porção glicídica do biossurfactante (L-raminose) a partir do sobrenadante livre de células, através de um teste colorimétrico descrito por Koch e colaboradores (1991), sendo posteriormente convertidos a raminolipídeos (g/L) por um fator obtido através de análise de espectrometria de massas.

#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO

##### 4.4.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A determinação da tensão superficial (mN/m) dos sobrenadantes livres de células foram realizadas em um tensiômetro Aqua-Pi (Kibron) e calibrado com água pura, a 25°C.

Para a determinação do índice de emulsificação (%), o método de Cooper e Goldenberg (1987) foi utilizado. Para melhor avaliação, cinco diferentes substratos foram empregados para os ensaios de emulsificação.

#### 4.4.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

##### 4.4.2.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Análises do extrato bruto e do extrato bruto hidrolisado dos biossurfactantes produzidos pelas cepas *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> e LMM21 foram realizados em placas de vidro contendo sílica (F254, Merck). Diferentes sistemas foram testados, com base na revisão escrita por Howe e colaboradores (2008):

- Acetona: n-butanol:água (5:4:1);
- Etanol:Hexano:Ác.Acético Glacial (70:30:1);
- Clorofórmio:Metanol:Água (60:15:4);
- Clorofórmio:Metanol:CaCl<sub>2</sub> 2% (2:1:0,2);
- Acetonitrila:Água (3:1);
- Acetona: Hexano:Ác.Acético (30:70:1);
- Acetato de Etila: Ác. Acético:Água (3:1:3).

Ao fim dos testes, foi utilizado o método descrito por Howe e colaboradores (2008) com modificações. Uma fase móvel composta por Clorofórmio:Metanol:Ácido acético Glacial (80:18:2) foi utilizada para o extrato bruto, enquanto que para a análise de açúcares presentes na fração hidrofílica do extrato hidrolisado, uma fase móvel menos hidrofóbica composta por Clorofórmio:Metanol:Água (65:25:4) foi utilizada. Após eluição, as placas foram jateadas com solução de ácido sulfúrico 55% contendo Orcinol (0.28%) e reveladas a 80°C por 5 minutos. Os raminolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* PAO1 foram utilizados como padrão interno. Para a análise de açúcares, padrões de açúcares da Sigma em concentração de 5 mg/mL foram utilizados.

##### 4.4.2.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - HPLC

Os biossurfactantes extraídos a partir dos sobrenadantes livres de células dos cultivos das cepas *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>, *B. kururiensis* LMM21 e *P. aeruginosa* PAO1 foram isoladas da mistura com a utilização de um HPLC equipado com um degaseificador DGU-20A5, um cromatógrafo líquido LC-20AT, um auto-amostrador SIL-20A, um forno CTO-20A, detector de índice de refração RID-10A, um detector de arranjo de diodo SPD-M20A, um coletor de frações FRC-10<sup>a</sup> e um módulo de comunicações CBM-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan). A separação foi realizada em coluna C18 (150 X 4.6 mm, Shimadzu) em um método

de gradiente utilizando acetonitrila- $\text{H}_3\text{PO}_4$  (3.3 mM), apresentado na Tabela 5, em fluxo de 1,0 mL/min.

Tabela 5. Gradiente de eluição das amostras contendo biossurfactantes em *HPLC*.

Tempo (min)	% acetonitrila	% $\text{H}_3\text{PO}_4$ (3.3 mM)
0-50	2-60	98-40
51-64	60-100	40-0
65-80	100	0
81-90	100-2	0-98
91-100	2	98

Frações foram coletadas a cada 3 min. e a presença de espécies de raminolipídeos em frações individuais (39-51 min) foram determinadas utilizando um método colorimétrico (reação de orcinol) para a identificação de raminose. Para isto, as amostras foram secas e ressuspensas em volume igual de água.

#### 4.4.2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As análises dos extratos brutos dos biossurfactantes produzidos por *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> e LMM21 foram caracterizadas por FTIR com o sistema de espectroscopia Nicolet Magna-IR 760. As amostras com peso fixo foram uniformemente espalhadas em discos de KBr pré-pressurizados translúcidos. Os discos foram secos em um forno infravermelho para a remoção de solventes residuais. Os espectros, então, foram coletados em resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e cada background dos discos de KBr utilizados foi utilizado como branco da amostra.

#### 4.4.2.4. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS BIOSSURFACTANTES POR LTQ-ORBITRAP VELOS MS

Todos os reagentes utilizados nesta etapa do trabalho foram obtidos na Tedia Brazil (Rio de Janeiro, RJ), sendo reagentes analíticos (grau *HPLC*).

Para a análise em Orbitrap, foram utilizados os extratos obtidos a partir da produção em meio MSP suplementado com glicerol. Todas as amostras foram ressuspensas em metanol:clorofórmio:2-propanol em proporção 1:2:4(v/v/v), contendo 7.5 mM de acetato de

amônio, sendo então centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos, para a precipitação de quaisquer contaminantes.

As amostras de biossurfactantes foram analisadas por injeção direta em um LTQ OrbitrapVelos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização do tipo nanoelectrospray, utilizando capilares de nanofluxo (PicoTip Emitter, Glass Tip, coating 1P-4P, New Objective, MA, USA), com a voltagem de ionização de 2.0 kV e a temperatura de transferência do capilar a 180°C. Cada ciclo de aquisição de dados consistiu em uma busca no Orbitrap sob poder de resolução de massas de 60 000 (FWHM, à  $m/z$  400) na faixa de  $m/z$  de 100-2.000 Da, seguido por uma fragmentação em MS2 dos íons precursores mais abundantes por CID (collision-induced dissociation) no linear trap ou na célula de HCD (higher energy collision-induced dissociation). Íons precursores foram analisados dentro da faixa de  $m/z$  de 400-800 Da e fragmentos foram detectados no Orbitrap em resolução de 60.000. Energias de colisão normalizadas de 35% no CID e 50% no HCD foram utilizadas para a fragmentação dos íons no Orbitrap.

O cálculo das fórmulas químicas das medidas precisas dos valores de  $m/z$  e processamento de dados dos EICs (Extracted Ion Current) foram concluídas no programa Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific Inc. Co.). EICs de alta resolução foram obtidos pelo processamento do espectro em full scan, sendo utilizados íons que potencialmente são referentes a raminolipídeos com uma tolerância de massa de 15 ppm. Os íons potencialmente candidatos foram obtidos pelo cálculo da massa isobárica com o programa ISOPRO v3.1.

Quantificação relativa dos biossurfactantes: A quantificação relativa das populações de biossurfactantes foi realizada a partir do espectro em modo full scan, a partir do qual foram observadas as integrais das áreas relativas dos íons moleculares referentes às espécies de raminolipídeos. A partir desta relação, foi realizado um cálculo, determinando a relação entre porção hidrofílica e hidrofóbica dos biossurfactantes produzidos, afim de se chegar a um fator de conversão para a dosagem de raminose por orcinol.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CULTIVO E PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

Como citado anteriormente a via biossintética dos raminolipídeos em *P. aeruginosa* envolve três reações sequenciais (Figura 2). A primeira reação é catalisada pela enzima RhIA, que emprega ácidos graxos  $\beta$ -hidroxilados como substratos, seguido pela raminosil-transferase 1 (RT1) que utiliza dTDP-L-raminose como seu substrato, gerando os mono-raminolipídeos (Ochsner *et al.* 1994). Os mono-raminolipídeos e DTDP-L-raminose são substratos para a raminosil-transferase 2 (RT2), formando os di-raminolipídeos (Rahim *et al.*, 2001). A RT1 compreende uma proteína associada à membrana, RhIB, enquanto RT2 corresponde a uma proteína de cadeia simples, RhIC (Rahim *et al.* 2001).

A utilização da *Burkholderia kururiensis* como hospedeiro heterólogo mostrou-se promissora já que há uma proximidade filogenética entre os gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*. Por ser um simbiote vegetal e de vida livre, não apresentando marcas de virulência, *B. kururiensis* apresenta uma vantagem importante em relação à *P. aeruginosa*. Os biosurfactantes produzidos por uma linhagem geneticamente modificada, *B. kururiensis* LMM21 foram caracterizados (Tavares, 2012), onde identificou-se que esta cepa era produtora de raminolipídeos, demonstrando também grande capacidade de produzir raminolipídeos em presença de diferentes fontes de carbono.

Nesta primeira parte do trabalho os biosurfactantes da *B. kururiensis* LMM21 foram produzidos, isolados, quantificados e comparados aos glicolipídeos produzidos pela *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> e pela *P. aeruginosa* PAO1.

É válido ressaltar que os ensaios envolvendo a produção e comparações dos biosurfactantes obtidos foram realizadas em meio MSP suplementado com diversas fontes de carbono, porém para a segunda etapa, de caracterização, os biosurfactantes foram extraídos apenas do meio de cultivo MSP contendo glicerol como única fonte de carbono.

#### 5.1.1. QUANTIFICAÇÃO DOS GLICOLIPÍDEOS

Uma vez que as cepas foram cultivadas, a produção de raminolipídeos foi quantificada por equivalentes de raminose. Na Figura 18, através do ensaio de orcinol, conseguimos medir indiretamente os equivalentes de raminose, que posteriormente foram convertidos a raminolipídeos. Podemos ver que a cepa *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> apresentou produção de

0,78g/L de raminolipídeos e a cepa de *P. aeruginosa* 4,09 g/L. Já a cepa geneticamente modificada (LMM21) apresentou a produção de 5,63 g/L de raminolipídeos. Assim, observamos que há um aumento significativo na cepa LMM21 quando comparada às outras cepas selvagens, sendo maior inclusive do que a própria *P. aeruginosa* PAO1.

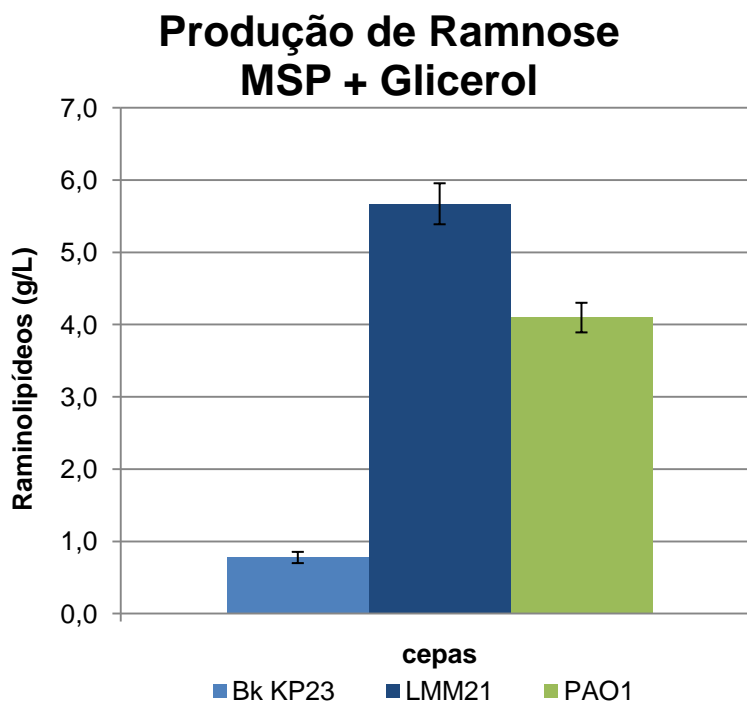


Figura 18. Análise de produção de raminose nas três diferentes cepas em meio mínimo, utilizando glicerol como fonte de carbono. Neste gráfico podemos avaliar que a cepa recombinante LMM21 apresenta maior produção de glicolipídeos do que as cepas selvagens.

### 5.1.2. DIVERSIFICAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Como anteriormente citado, a investigação envolvendo a utilização de diferentes fontes de carbono para a produção de biossurfactantes foi conduzida a partir das cepas selecionadas nos dois screenings. Assim, foram testadas inicialmente, para a cepa *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> e *B. kururiensis* LMM21, em 13 diferentes fontes de carbono (glicerol; óleo de oliva; óleo de soja; óleo de canola; óleo de milho; óleo de girassol; óleo de babaçu; n-hexadecano; óleo mineral; óleo de motor; biodiesel metílico de soja; glicerina bruta e óleo diesel) (Figura 19). Observa-se que em diferentes fontes de carbono a produção dos raminolipídeos é diferenciada e os meios contendo glicerol, glicerina bruta, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de babaçu e biodiesel apresentaram melhores índices de produção de

raminolípeo por células viáveis, chegando a ser cinco vezes superiores aos índices encontrados quando outros substratos foram testados.

Neste caso, um resultado interessante foi a produção de raminolípeos a partir da glicerina bruta, uma vez que o acúmulo nas indústrias desta matéria-prima tem sido uma grande problemática devido à falta de lugares para estocagem e tratamento para purificação.

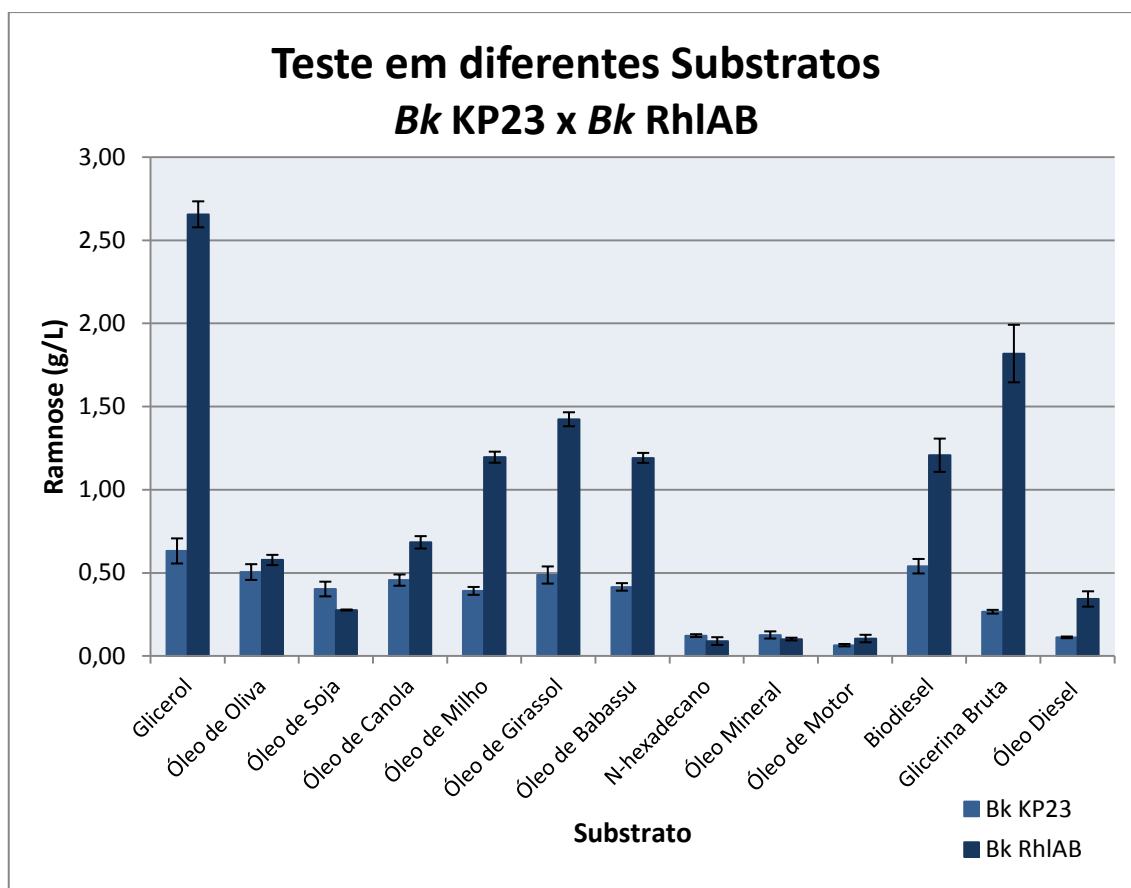


Figura 19. Rendimento da produção de raminolípeos ao fim de 240 horas de cultivo em meio MSP suplementado com diferentes substratos.

## 5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS RAMINOLÍPEOS PRODUZIDOS PELA CEPA LMM21

### 5.2.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As propriedades físico-químicas dos raminolípeos produzidos pela cepa *B. kururiensis* LMM21, presentes no sobrenadante livre de células, foram verificadas através da medida da emulsificação do sobrenadante com diferentes substratos (Figura 20) e da medida da redução da tensão superficial pelo sobrenadante (Figura 21).

Quando são analisados os aspectos físico-químicos dos biossurfactantes produzidos pela cepa *B. kururiensis* LMM21, é possível observar que como foi feita a mistura de homólogos, também é possível observar que a produção resultante determina propriedade diferenciadas no biossurfactante, e mesmo com pequenas mudanças na composição da mistura pode resultar em grandes efeitos nas suas propriedades físico-químicas (Tabela 6).

Como pode ser observado na Tabela 6, houve novamente uma grande variação nos índices de emulsificação, o que pode estar relacionado à natureza da mistura de raminolipídeos produzidos, assim como a presença de interferentes presentes no sobrenadante livre de células. Portanto, os melhores resultados foram alcançados a partir dos meios suplementados com glicerol, com uma média de índice de emulsificação de 55,2 %, seguido pelos meios suplementados com glicerina loira, n-hexadecano, óleo de oliva e de diesel (64,9, 62,1, 58,6 e 55,2 % respectivamente).

É sabido que a fonte de carbono utilizada na produção dos raminolipídeos pode influenciar na mistura de biossurfactantes sintetizadas pelas células (Abdel-Mawgod *et al*, 2011). De fato, foi interessante a investigação de outros substratos para emulsificação. Neste caso, as melhores fontes de carbono para emulsificação por biossurfactantes da *B. kururiensis* LMM21 em relação a *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> (Figura 20) foram a glicerina bruta, o óleo de motor, o óleo diesel e o n-hexadecano, enquanto que para a *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>, embora o óleo de soja também tenha rendido bons resultados, as melhores fontes de carbono para emulsificação foram o óleo de milho e o óleo de girassol.

Tabela 6. Produção de raminoipídios (g/L), Índice de Emulsificação (E24%) e Tensão Superficial (mN/m). A partir do sobrenadante livre de células obtidos após cultivo da cepa *B. kururiensis* LMM21 em meio MSP suplementado com diferentes fontes de carbono, por 240 horas de cultivo, em função da emulsão com diferentes substratos.

Substrato	Raminolipídeos ( g/L)	Emulsificação (%)	Tensão superficial (mN/m)
<b>Glicerol</b>	7,43	55,2	31,0
<b>Óleo de oliva</b>	1,61	58,6	30,2
<b>Óleo de soja</b>	0,77	51,7	30,8
<b>Óleo de canola</b>	1,91	48,5	30,0
<b>Óleo de Milho</b>	3,34	6,9	33,2
<b>Óleo de Girassol</b>	3,98	17,2	33,3
<b>Óleo de Babaçu</b>	3,33	55,2	30,9
<b>N-hexadecano</b>	0,25	62,1	35,7

<b>Óleo Mineral</b>	0,28	44,8	46,9
<b>Óleo de motor</b>	0,29	31	48,5
<b>Biodiesel de soja</b>	3,38	56,7	33,3
<b>Glicerina loira</b>	5,09	64,9	32,8
<b>Óleo diesel</b>	0,96	55,2	31,4

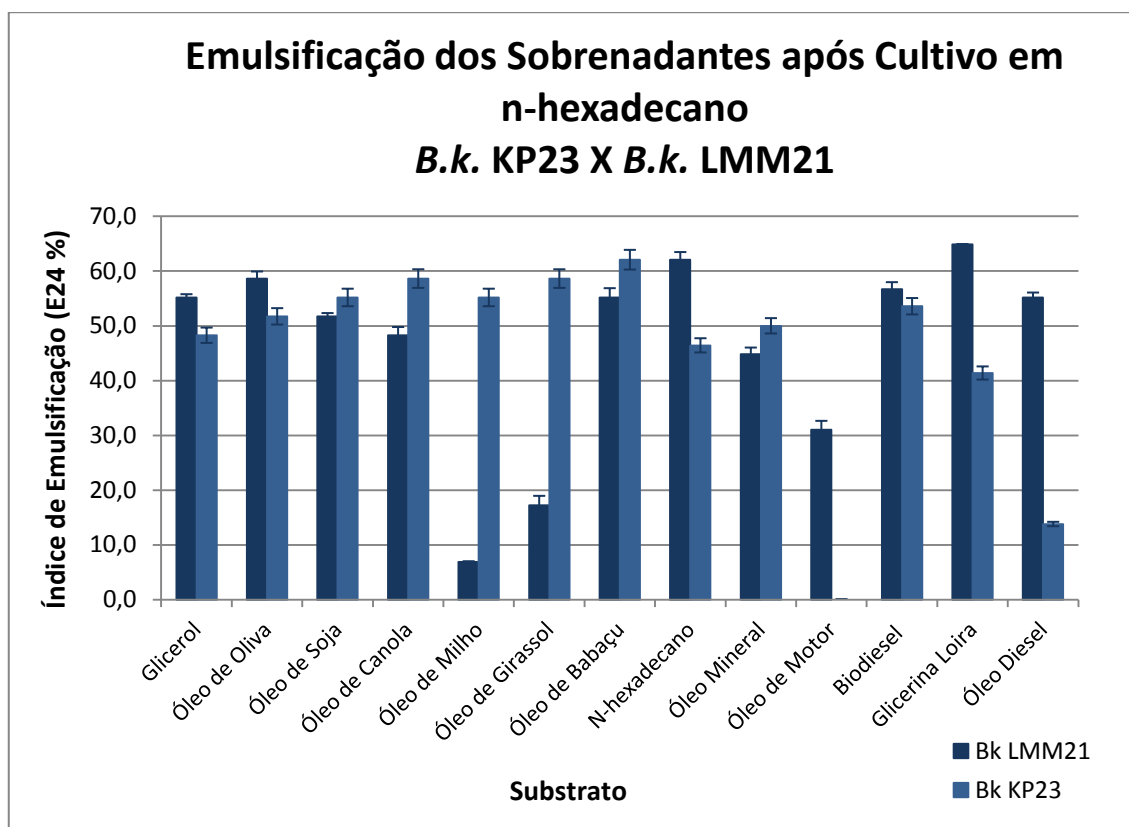


Figura 20. Índice de emulsificação dos sobrenadantes oriundos do cultivo em MSP envolvendo as cepas *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> e *B. kururiensis* LMM21, suplementados com suas respectivas fontes de carbono.

Os valores de tensão superficial (Figura 21) apresentam valores similares e estão de acordo com os valores descritos na literatura para biossurfactantes que ficam entre 25 e 40 mN/m, exceto o valor encontrado para o n-hexadecano, óleo mineral e óleo de motor que apresentaram o índice acima de 40,0 mN/m.

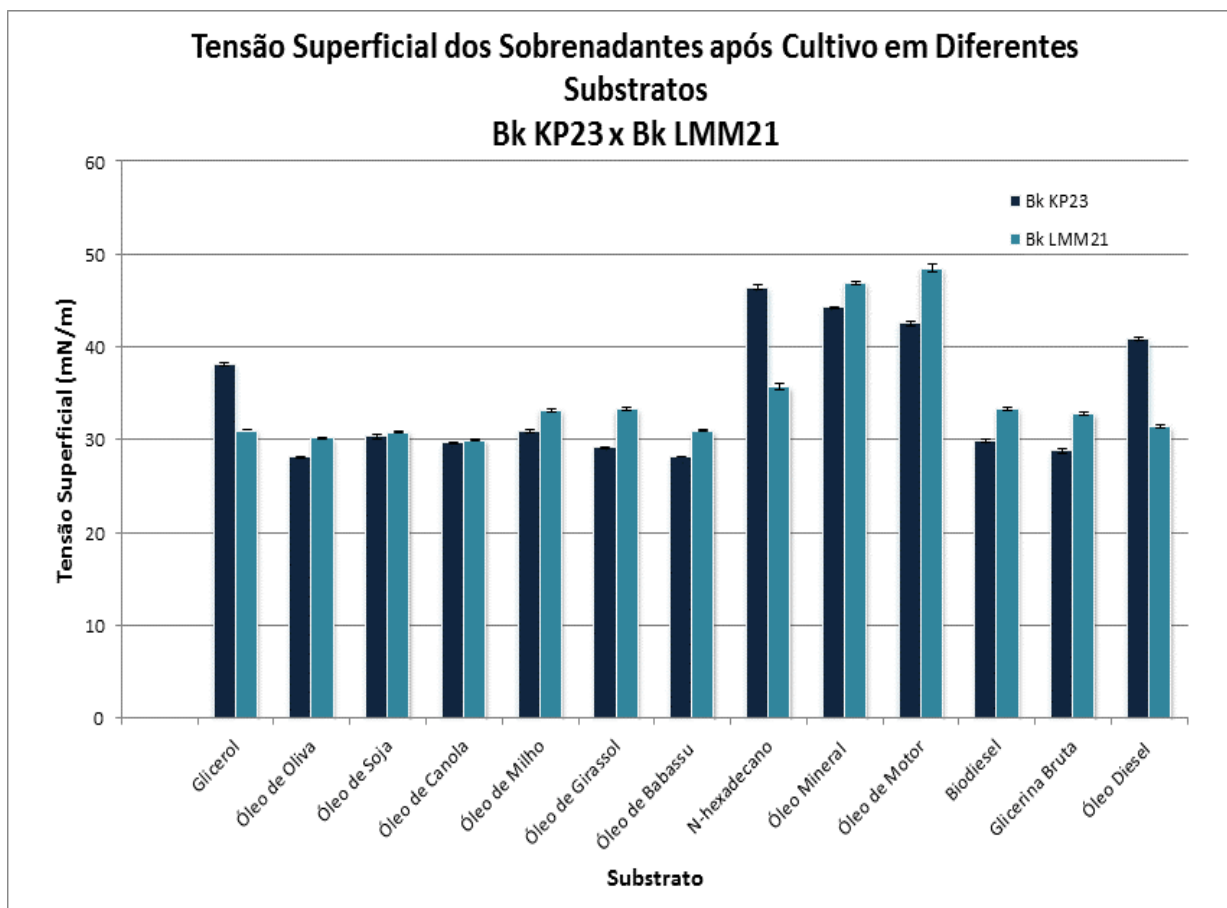


Figura 21. Tensão Superficial dos sobrenadantes oriundos do cultivo em MSP envolvendo as cepas *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> e *B. kururiensis* LMM21, suplementados com várias fontes de carbono.

## 5.2.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS BIOSSURFACTANTES

### 5.2.2.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Análises do extrato bruto e do extrato bruto hidrolisado dos biossurfactantes produzidos pelas cepas *P. aeruginosa* PAO1, *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> e *B. kururiensis* LMM21 foram realizados em placas de vidro contendo sílica. Diferentes sistemas foram testados, porém ao fim dos testes, foi utilizado o método descrito por Howe e colaboradores (2008) com modificações a qual uma fase móvel composta por Clorofórmio:Metanol:Ácido acético (80:18:2) foi utilizada para o extrato bruto, enquanto para a análise de açúcares presentes na fração hidrofílica do extrato hidrolisado, uma fase móvel menos hidrofóbica composta por Clorofórmio:Metanol:Água (65:25:4) foi utilizada. Após eluição, as placas foram jateadas com solução de ácido sulfúrico 55% contendo Orcinol (0.28%) e reveladas.

Os raminolípídeos produzidos por *P. aeruginosa* PAO1 foram utilizados como padrão interno e para a análise de açúcares, padrões de açúcares a uma concentração de 5 mg/mL foram utilizados.

Portanto, com base nas condições otimizadas, foram realizadas as análises do extrato bruto produzido pela cepa *B. kururiensis* LMM21. A Figura 22 apresenta os resultados observados neste experimento.

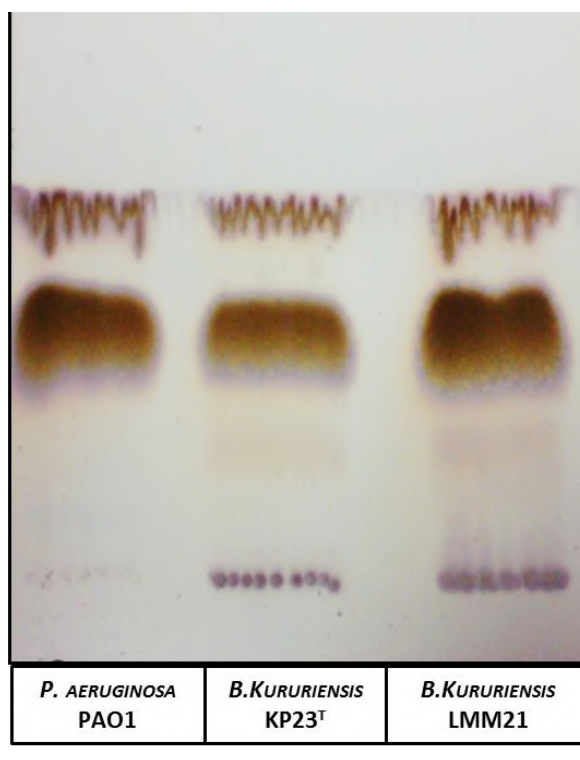


Figura 22. Análise do extrato bruto por cromatografia em camada delgada dos biossurfactantes produzidos pela cepa *B. kururiensis* LMM21 e *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>, utilizando como padrão interno o raminolípídeo produzido pela *P. aeruginosa* PAO1.

Logo, como pode ser observado na Figura 22, os perfis de eluição são similares entre os extratos brutos dos biossurfactantes produzidos pelas cepas *B. kururiensis* LMM21, *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> e *P. aeruginosa* PAO1. Para as três cepas observa-se a presença de duas bandas principais, que seriam equivalentes aos mono-raminolípídeos ( $R_f = 0,98$ ) e di-raminolípídeos ( $R_f = 0,75$  para PAO1 e *B. kururiensis* LMM21, e 0,70 para *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>). Este resultado nos permite deduzir que o biossurfactante produzido pela cepa *B. kururiensis* LMM21 é uma confirmação que glicolípídeo produzido é raminolípídeo, uma vez que apresenta  $R_f$  similar à da cepa PAO1, utilizada como padrão em nossos experimentos,

além do fato das bandas terem sido reveladas por um reagente específico para pentoses e hexoses (orcinol).

#### 5.2.2.2. CROMATROGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - HPLC

Os biossurfactantes extraídos a partir dos sobrenadantes livres de células dos cultivos das cepas *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>, *B. kururiensis* LMM21 e *P. aeruginosa* PAO1 foram separados da mistura e analisados por cromatografia. Nesta separação foi realizada a identificação da fração hidrofílica, contendo a porção glicídica do biossurfactante, este ensaio foi realizado a fim de ratificar os resultados anteriormente obtidos na cromatografia em camada delgada.

Como pode ser observado na Figura 23, o perfil de eluição dos biossurfactantes produzidos pela cepa *B. kururiensis* LMM21 é mais similar ao da cepa *P. aeruginosa* PAO1 do que o observado para a cepa *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>. Assim, é possível observar que o tempo de eluição ocorre em um ponto mais hidrofóbico do gradiente de acetonitrila, onde existe a separação em dois grupos. A primeira eluição da coluna ocorre com um percentual entre 90 e 100% de acetonitrila (*B. kururiensis* KP23<sup>T</sup>), e a segunda eluição ocorre completamente após a manutenção do percentual de acetonitrila do gradiente em 100% (*P. aeruginosa* e *B. kururiensis* LMM21), indicando uma maior hidrofobicidade das amostras.

Assim, podemos também analisar as frações obtidas (Figura 23) e observar que o tempo de eluição das frações correspondentes à cepa recombinante e a *P. aeruginosa* PAO1 apresentam um perfil cromatográfico semelhante, enquanto a cepa de *B. kururiensis* exibe um tempo de retenção menor. Isto indica que o biossurfactante produzido pela cepa *B. kururiensis* LMM21 apresenta afinidade química com a coluna similar ao raminolípídeo produzido pela *P. aeruginosa* PAO1.



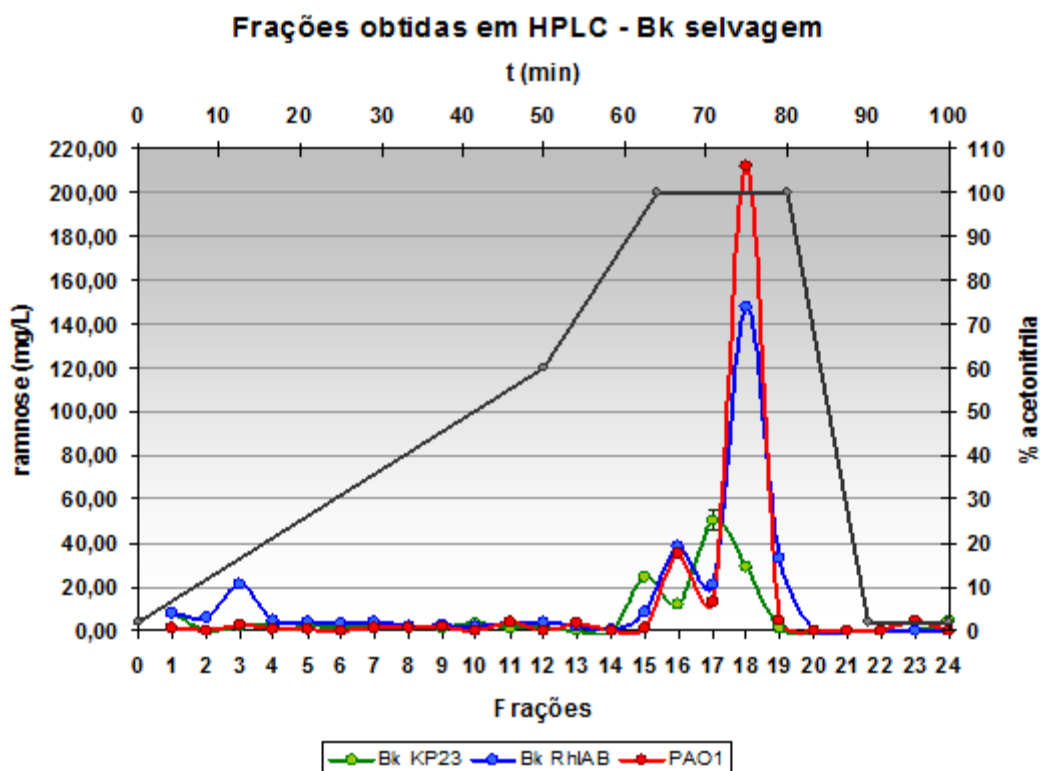


Figura 23. Perfil cromatográfico das amostras obtidas por HPLC das cepas de *B. kururiensis* LMM21 (azul), *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> (verde) e *P. aeruginosa* PAO1 (vermelho).

#### 5.2.2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As análises dos extratos brutos dos biossurfactantes produzidos pela *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> e *B. kururiensis* LMM21 e *P. aeruginosa* PAO1 foram caracterizadas por FTIR, onde foram encontradas frequências de absorção características das ligações correspondentes à ramnose.

Na figura abaixo (Figura 24) podemos observar as vibrações em  $3400\text{--}3350\text{ cm}^{-1}$  equivalentes à vibração de deformação axial da ligação O-H do açúcar e sua intensidade pode ser explicada por formação de ligação de hidrogênio entre moléculas. De fato, esta vibração provavelmente é do açúcar, pois, se fosse correspondente ao ácido graxo esta frequência de vibração sofreria um deslocamento para a região de  $3300\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ . Em  $2970\text{--}2830\text{ cm}^{-1}$  podemos observar as deformações correspondentes a vibrações axiais antissimétricas e simétricas da ligação C-H de  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ . Em  $1737\text{ cm}^{-1}$  temos a vibração correspondente a deformação axial de C=O de ester. Em  $1574\text{ cm}^{-1}$  temos a deformação angular da ligação C-H de alquenos também apresentando duplete em  $984\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1320\text{--}1210\text{ cm}^{-1}$  temos a

vibração correspondente a deformação axial de O-C-C de ácidos carboxílicos e em  $1053\text{ cm}^{-1}$  podemos observar a vibração de ligação C-O-C axial que para compostos cíclicos sabemos que há uma redução na frequência de vibração com maior tensão no anel – em compostos alifáticos a deformação fica entre  $1150\text{-}1085\text{ cm}^{-1}$ .

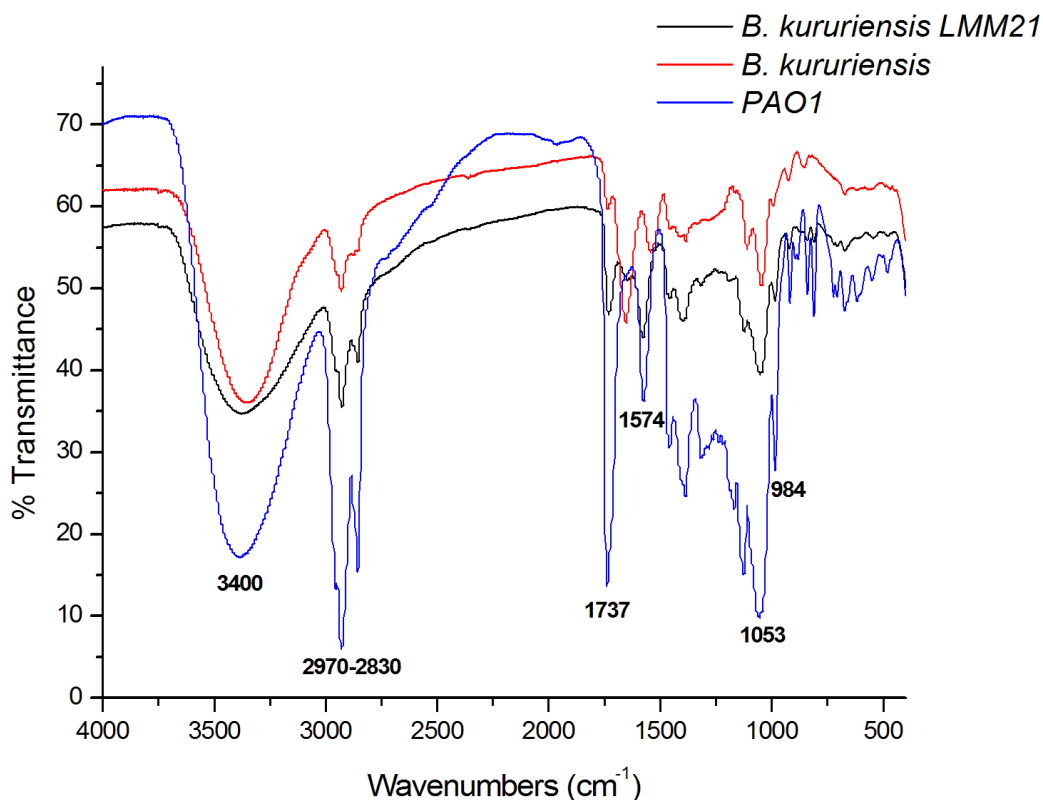


Figura 24. Espectro de absorção na região do infravermelho das cepas *B. kururiensis* LMM21, *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> e *P. aeruginosa* PAO1.

#### 5.2.2.4. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS BIOSSURFACTANTES POR LTQ-ORBITRAP VELOS MS

A certificação das análises realizadas por CCD e HPLC precisavam ser confirmadas com uma técnica de mais alta precisão, por isso foi utilizado o *ESI-LTQ Orbitrap Velos MS*, com injeção direta por um capilar de nanofluxo, o que elimina o problema da retenção por alguma matriz, além de adicionar a vantagem da fragmentação das espécies investigadas. A alta sensibilidade e seletividade deste aparelho e grande poder de resolução forneceu espectros de massa por transformada de Fourier. Uma vantagem da utilização deste aparelho foi a resolução de isobaros e compostos com massa idêntica, mas com cadeias de ácidos

graxos diferentes. A Tabela 7 abaixo apresenta os resultados obtidos, mostrando as espécies de raminolipídeos identificadas após fragmentação nas células de colisão.

Assim, os biossurfactantes produzidos pela cepa LMM21 foram confirmados como sendo raminolipídeos. A análise por *ESI-LTQ-Orbitrap-Velos MS* resultou na identificação de um total de 28 espécies diferentes de raminolipídeos, alguns dos quais estão representadas na Figura 25.

Tabela 7. Espécies de raminolipídeos identificadas pela análise do extrato bruto obtido após cultivo da cepa *B.kururiensis* LMM21 em MSP contendo glicerol como substrato, por injeção direta em *ESI-LTQ-Orbitrap Velos-MS*.

Espécie	Fórmula molecular	Íon Molecular [M] <sup>-H</sup>	Íons de fragmentação (m/z)
<b>Rha-C<sub>8</sub>C<sub>8</sub></b>	C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	447	141, 163, 283, 305
<b>Rha-C<sub>8</sub>C<sub>10</sub></b>	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	475	141, 163, 169, 305, 311
<b>Rha-C<sub>10</sub>C<sub>8</sub></b>	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	475	141, 163, 311, 333
<b>Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub></b>	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>	503	163, 169, 333, 339
<b>Rha-C<sub>10</sub>C<sub>12:1</sub></b>	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	529	169, 195, 333, 365
<b>Rha-C<sub>12:1</sub>C<sub>10</sub></b>	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	529	169,195, 359, 365
<b>Rha-C<sub>10</sub>C<sub>12</sub></b>	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> O <sub>9</sub>	531	163, 169, 197, 333, 367
<b>Rha-C<sub>12</sub>C<sub>10</sub></b>	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> O <sub>9</sub>	531	163, 169, 197, 361, 367
<b>Rha-C<sub>10</sub>C<sub>14</sub></b>	C <sub>30</sub> H <sub>56</sub> O <sub>9</sub>	559	163, 169, 225, 333, 395
<b>Rha-C<sub>14</sub>C<sub>10</sub></b>	C <sub>30</sub> H <sub>56</sub> O <sub>9</sub>	559	163, 169, 225, 389, 395
<b>Rha-C<sub>12</sub>C<sub>12</sub></b>	C <sub>30</sub> H <sub>56</sub> O <sub>9</sub>	559	163, 197, 361, 395
<b>Rha-C<sub>12</sub>C<sub>14</sub></b>	C <sub>32</sub> H <sub>60</sub> O <sub>9</sub>	587	163, 197, 225
<b>Rha-C<sub>10</sub>C<sub>16</sub></b>	C <sub>32</sub> H <sub>60</sub> O <sub>9</sub>	587	163, 169, 253
<b>Rha-C<sub>14</sub>C<sub>14</sub></b>	C <sub>34</sub> H <sub>64</sub> O <sub>9</sub>	615	451
<b>Rha-Rha-C<sub>8</sub>C<sub>10</sub></b>	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>13</sub>	621	141, 163, 169, 311, 451
<b>Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>8</sub></b>	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>13</sub>	621	141, 163, 169, 311, 479

<b>Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub></b>	<b>C<sub>32</sub>H<sub>58</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>649</b>	<b>163, 169, 339, 479</b>
<b>Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>12</sub></b>	<b>C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>677</b>	<b>103, 119, 163, 169, 197, 479</b>
<b>Rha-Rha-C<sub>12</sub>C<sub>10</sub></b>	<b>C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>677</b>	<b>103, 119, 163, 169, 197, 507</b>
<b>Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>14:1</sub></b>	<b>C<sub>36</sub>H<sub>64</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>703</b>	<b>163, 169, 223, 393, 479, 533</b>
<b>Rha-Rha-C<sub>12</sub>C<sub>12:1</sub></b>	<b>C<sub>36</sub>H<sub>64</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>703</b>	<b>163, 197, 393, 507</b>
<b>Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>14</sub></b>	<b>C<sub>36</sub>H<sub>66</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>705</b>	<b>163, 169, 225, 395, 479</b>
<b>Rha-Rha-C<sub>14</sub>C<sub>10</sub></b>	<b>C<sub>36</sub>H<sub>66</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>705</b>	<b>163, 169, 225, 395, 535</b>
<b>Rha-Rha-C<sub>12</sub>C<sub>12</sub></b>	<b>C<sub>36</sub>H<sub>66</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>705</b>	<b>163, 197, 395, 507</b>
<b>Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>16</sub></b>	<b>C<sub>38</sub>H<sub>70</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>733</b>	<b>163, 169, 253, 422, 479</b>
<b>Rha-Rha-C<sub>16</sub>C<sub>10</sub></b>	<b>C<sub>38</sub>H<sub>70</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>733</b>	<b>163, 169, 253, 422, 563</b>
<b>Rha-Rha-C<sub>12</sub>C<sub>14</sub></b>	<b>C<sub>38</sub>H<sub>70</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>733</b>	<b>163, 197, 225, 422, 507</b>
<b>Rha-Rha-C<sub>14</sub>C<sub>12</sub></b>	<b>C<sub>38</sub>H<sub>70</sub>O<sub>13</sub></b>	<b>733</b>	<b>163, 197, 225, 422, 535</b>

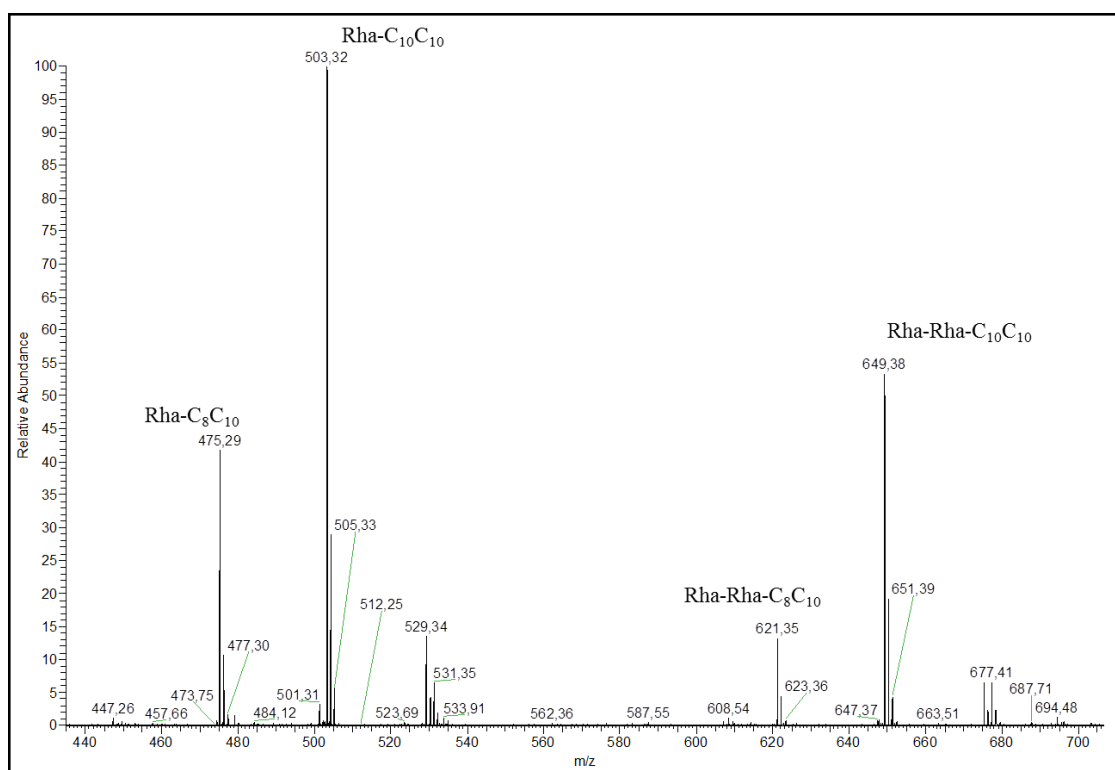


Figura 25. Análise por *full scan* dos raminolipídeos produzidos pela cepa *B.kururiensis* LMM21, identificados por *ESI-LTQ-Orbitrap hybrid MS*.

Foram detectados uma população de espécies produzidas em torno de 65% como mono-raminolípeidos, observando-se também uma grande variedade no tamanho das cadeias de ácido graxo, com cadeias entre  $C_8$  e  $C_{16}$ . Um espectro isolado de um di-raminolípeido, com a sua fragmentação pode ser observado na Figura 26.

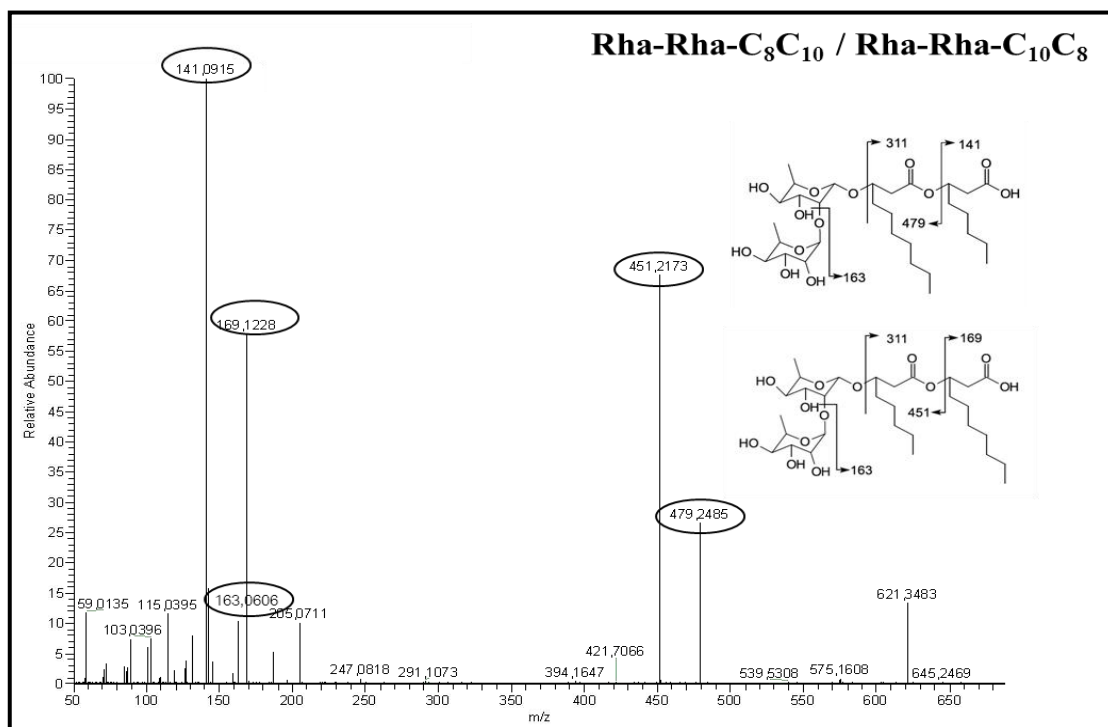


Figura 26. Identificação dos isobaros Rha-Rha- $C_8C_{10}$  e Rha-Rha- $C_{10}C_8$ , produzidos pela cepa *B. kururiensis* LMM21. Os produtos da fragmentação ( $MS^2$ ) do íon 621,3483 a partir da análise dos fragmentos do íon precursor típicos dessas espécies.

A importância da utilização desta técnica é que quando parte da população não é identificada na verdade é caracterizado como sendo um composto com um arranjo de cadeias de ácido graxo diferente. Por exemplo, no lugar de apenas mono- e di-raminolípeidos com cadeias  $C_{12}C_{12}$ , a análise por orbitrap resultou na identificação também de espécies com a porção hidrofóbica contendo cadeias do tipo  $C_{10}C_{14}$  e  $C_{14}C_{10}$ . Esses dados ressaltam a importância da fragmentação para a identificação exata das espécies produzidas, pois, de outra forma, a mesma pode ser tanto subestimada como superestimada, devido à falta de informação que permita definir espécies com mesma massa, mas com diferente estrutura molecular.

Não foram observadas cadeias de ácidos graxos como  $C_{14}C_{16}$  dentre as identificadas pela análise em Orbitrap, o que, como previamente discutido, é atípico para bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia*, que tipicamente produzem raminolípeidos com cadeias

longas de ácido graxo. A população de raminolipídeos produzidos por *B. kururiensis* LMM21 contém não somente espécies descritas como típicas para *Burkholderia*, mas algumas relacionadas ao gênero *Pseudomonas*, como mono- e di-raminolipídeos contendo cadeias de ácido graxo C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>-C<sub>12:1</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>10:1</sub>, C<sub>10:1</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>12:1</sub>, C<sub>12:1</sub>-C<sub>8</sub> e C<sub>10</sub>-C<sub>14:1</sub>, além das novas espécies identificadas, C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> e C<sub>16</sub>C<sub>10</sub>. Um fator que pode estar relacionado a este fenômeno é a distância filogenética de *B. kururiensis* (Suárez-Moreno *et al.*, 2012) em relação às espécies de *Burkholderia* produtoras de raminolipídeos, como já previamente discutido.

A Figura 27 apresenta o isolamento de um pico isobárico de Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>, exemplificando o poder de resolução do aparelho.

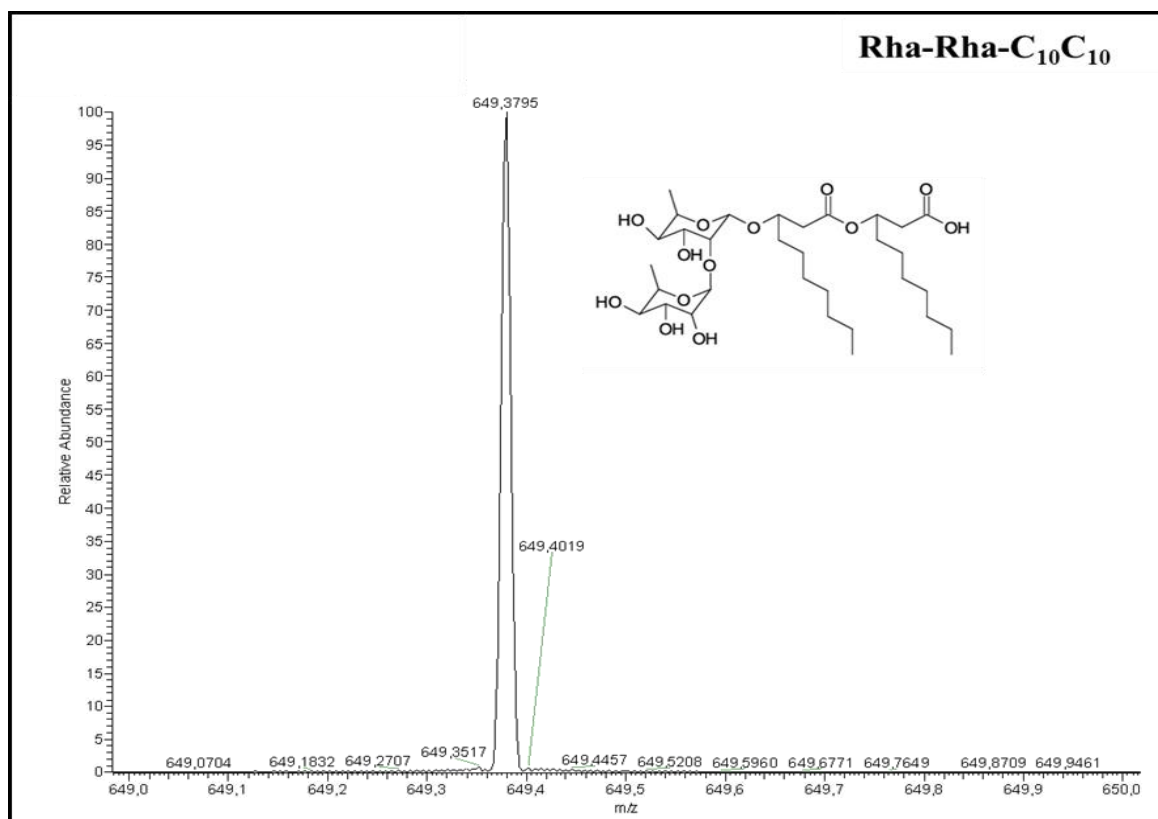


Figura 27. Isolamento do pico isobárico de Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub> de *B. kururiensis* LMM21. A análise foi realizada por *ESI-LTQ-Orbitrap hybrid MS* e o isolamento ilustra um melhor poder de resolução do instrumento, dentro dos parâmetros designados do experimento.

Foi possível também notar uma grande diferença entre as espécies produzidas por *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> e LMM21. Onde foi observada modificação no percentual de espécies de raminolipídeos. Enquanto a produção da *B. kururiensis* KP23<sup>T</sup> é formada por 88,70% de di-raminolipídeos, a *B. kururiensis* LMM21 está em aproximadamente 35%. Na Tabela 8 tem-se

a quantificação relativa das espécies de raminolipídeos, produzidas pela LMM21, que foram detectados pela técnica.

Tabela 8. Quantificação relativa da população de raminolipídeos produzidos pela cepa *B.kururiensis* LMM21. A análise foi realizada por injeção direta em *ESI-LTQ-Orbitrap Velos MS*.

Íon Molecular	Composto	Fórmula molecular	Intensidade	Intensid. relativa
Mono-raminolipídeos				
475,2935	Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	2034986,6	16,33
501,3091	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10:1</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> O <sub>9</sub>	146086,9	1,17
503,3245	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	5009293,5	40,19
529,3394	Rha-C <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub> Rha-C <sub>12:1</sub> C <sub>10</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	674337,8	5,41
531,3546	Rha-C <sub>10</sub> C <sub>12</sub> Rha-C <sub>12</sub> C <sub>10</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> O <sub>9</sub>	319868,8	2,57
Total		65,66 %		
Di-raminolipídeos				
479,2513	Rha-Rha-C <sub>10</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>	92088,4	0,74
505,3298	Rha-Rha-C <sub>12:1</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>11</sub>	281676,2	2,26
621,3511	Rha-Rha-C <sub>8</sub> C <sub>10</sub> Rha-Rha-C <sub>10</sub> - C <sub>8</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>13</sub>	651174,9	5,22
649,3826	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>13</sub>	2611029,5	20,95
675,3972	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub> Rha-Rha- C <sub>12:1</sub> C <sub>10</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>60</sub> O <sub>13</sub>	321299,7	2,58
677,4124	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub> Rha-Rha- C <sub>12</sub> C <sub>10</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>	323276,7	2,59
Total		34,34 %		

Tabela 9. Quantificação relativa da população de raminolipídeos produzidos pela cepa *P. aeruginosa* PAO1. A análise foi realizada por injeção direta em *ESI-LTQ-Orbitrap hybrid MS*.

Íon Molecular	Composto	Fórmula molecular	Intensidade	Intensid. Relativa
<b>Mono-raminolipídeos</b>				
<b>475,2909</b>	Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	40138228	4,58
<b>503,3221</b>	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>	78006304	8,91
Total		<b>13,49 %</b>		
<b>Di-raminolipídeos</b>				
<b>505,3284</b>	Rha-Rha-C <sub>12:1</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>11</sub>	3571533,5	0,41
<b>593,3183</b>	Rha-Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>13</sub>	4930348	0,56
<b>621,3495</b>	Rha-Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>13</sub>	139628304	15,94
<b>647,3655</b>	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10:1</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub> O <sub>13</sub>	5117084,5	0,58
<b>649,3802</b>	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>13</sub>	523157248	59,74
<b>675,3961</b>	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub> Rha-Rha-C <sub>12:1</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>60</sub> O <sub>13</sub>	39422976	4,50
<b>677,412</b>	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub> Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>	41787280	4,77
Total			<b>86,51 %</b>	

Como pode ser comparado nas tabelas acima, existe diferença em relação à proporção de mono e di-raminolipídeos produzidos pela LMM21, quando comparada a PAO1. Enquanto a primeira produz 65,7% de mono-raminolipídeos, a segunda produz apenas 13,5%. Uma vez que algumas espécies existem apenas como subpopulações, estas não entraram nos cálculos pois não são significativas no cálculo de proporção entre as espécies. Porém é importante observar que quando comparados ao número de espécies pertencentes, há uma discrepância significativa a cada grupo a qual significa novamente que a estratégia molecular envolvida na construção da cepa LMM21 foi bem sucedida, já que foi detectada uma produção maior de mono-raminolipídeos. Embora não seja determinante para a concentração final de cada espécie, é válido observar que 88,70 % das espécies produzidas pela cepa selvagem são di-raminolipídeos.



É interessante observar que, mesmo que seja em maior quantidade, a LMM21 não concentra sua produção total em mono-raminolipídeos, que seria esperado, uma vez que a estratégia molecular envolve a superprodução da enzima envolvida na síntese de mono-raminolipídeos.

É interessante ressaltar também que a predominância de mono- ou di-raminolipídeos pode interferir consideravelmente nas propriedades físico-químicas da mistura produzida, devido às variações no balanço relativo do açúcar (hidrofílico) e das cadeias de ácido graxo (hidrofóbicos). A investigação das populações produzidas torna-se interessante para a formulação de novas misturas de surfactantes, direcionando a produção para reações desejáveis e com aplicações específicas. As propriedades de uma mistura de biosurfactantes podem interferir em processos como adsorção, agregação e micelização, afetando a solubilização, suspensão, dispersão e outras possíveis aplicações (Placwa-Plociniczak *et al.*, 2011). Quando aplicadas à biorremediação, a composição da mistura de raminolipídeos pode diretamente afetar seu desempenho como carreadores de contaminantes e sua habilidade de aumentar a biodisponibilidade desses no meio ambiente. Por exemplo, di-raminolipídeos apresentam uma capacidade reduzida de solubilização do fenantreno que mono-raminolipídeos, mas podem, no lugar, aumentar sua disponibilidade por micelização. Espécies de raminolipídeos com propriedades de redução da tensão superficial podem facilitar o transporte de agentes poluentes adsorvidos em solos (Mata-Sandoval *et al.*, 1999).

## 6. CONCLUSÕES

A utilização da bactéria *B. kururiensis* como hospedeira heteróloga para expressão dos genes *rhlA* e *rhlB* de *P. aeruginosa*, que gerou a cepa LMM21, mostrou-se como uma estratégia promissora. Dentre outras cepas recombinantes anteriormente testadas (dados não mostrados), a cepa *B. kururiensis* LMM21 destacou-se por uma produção significativamente aumentada de biossurfactante. Ensaio iniciais envolvendo este microorganismo resultaram na produção de raminolipídeos em taxas superiores até mesmo que a cepa controle *P. aeruginosa* PAO1, certificando o potencial da cepa recombinante.

Observou-se também, no presente trabalho, através da caracterização físico-química, que a superexpressão das enzimas RhlA e RhlB resultou na melhoria do índice emulsificação quando comparado à cepa selvagem. Esta melhoria foi observada principalmente nos meios suplementados com glicerina loira, n-hexadecano, óleo de oliva e diesel. Nos valores da tensão superficial pudemos ver que as cepas apresentaram valores similares e estão de acordo com os valores descritos para biossurfactantes que ficam entre 25 e 40 mN/m, exceto para os valores correspondentes ao n-hexadecano, óleo mineral e óleo de motor, que ficaram acima de 40,0 mN/m.

A caracterização estrutural da mistura de raminolipídeos gerou a identificação de 28 espécies de raminolipídeos diferentes, em proporções distintas. Uma grande diferença na proporção de mono-raminolipídeos (65,7%), em relação ao padrão *P. aeruginosa* PAO1 (13,8%) foi observada, o que pode mudar os tipos de aplicações a serem realizados, em função das diferentes propriedades físico-químicas resultantes desta variação.

Neste estudo também pudemos ver que a utilização de uma ferramenta analítica poderosa, tal como o *ESI-LTQ Orbitrap-Hybrid MS*, com injeção direta através de um sistema nanofluxo capilar, tem sido um instrumento fundamental para caracterização de compostos desconhecidos (Perry *et al.* 2008). Sua alta seletividade e poder de resolução nos proporcionaram melhores espectros de massas por transformada de Fourier do que os métodos que tinham anteriormente testados, LC-ESI-MS ou MALDI-TOF-MS2, que são normalmente usados para estrutural caracterização de biossurfactantes. Além disso, esta estratégia provou ser mais ágil do que os métodos anteriores.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Mawgoud A.M, Lepine F, Déziel E., Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011, 86:1323–1336

Alagappan, G., Cowan, R. M., Effect of temperature and dissolved oxygen on the growth kinetics of *Pseudomonas putida* F1 growing on benzene and toluene, *Chemosphere*, 2004, 54, pp. 1255-1265.

Ashcroft, A.E., Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. *Nat. Prod. Rep.*, 2003, 20, p. 202-215.

Ausubel, F. M., Brent, R., *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. 2002.

Banat, I. M., Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation, *Bioresour. Technol.* 1995, 51, p. 1-12.

Banat, I. M., Biosurfactants, more in demand in ever, *Biofutur*. 2000, 198, p. 44-47.

Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M. A., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source, *Journal of Food Engineering*, 2002, 54, p. 283-288.

Berkelman, T. and T. Stenstedt, 2-D Electrophoresis using immobilized gradients pH gradients - Principles and Methods. AB ed. 2001, Uppsala, Sweden: Amersham Biosciences. 100.

Bjellqvist, B., Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1982, 6(4), p. 317-339.

Bognolo, G., Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf*, 1999, v.152, p.41–52.

Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I., González-López, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes, *Science Total Environment*, 2008, doi:10.1016/j.scitotenv.2008.07.008

Christofi, N., Ivshina, I.B., Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J Appl Microbiol*, 2002, v.93, p. 915–929.

Cooper, D. G., Goldenberg, B. G., Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J., Kosaric, N., Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. *Appl Environ Microbiol*. 1981, vol.42, p. 408–412.

De Lima, P.M.S., "Engenharia metabólica e caracterização das vias biossintéticas e regulatórias da produção de rhamnolipídeos em *Burkholderia kururiensis*.", Tese de doutorado - Março, 2012. Programa de Bioquímica, IQ, UFRJ.

Desai, J. D., Banat, I.M., Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997, vol 61, p. 47-64.

Desai, J.D., Desai, A.J., Em Biosurfactants: production, propriets, applications, Kosaric, N., ed., Marcel Decker: New York, 1993, cap. 3.

Déziel, E., Lépine, F., Mawgoud, A., Mohammad, A., Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86, p. 1323-1336.

Dubeau D, Déziel E, Woods DE, Lépine F (2009) *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol* 9:263

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 1951, p. 167-168.

Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., Caballero-Mellado, J., *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67, p. 2790-8.

Ferreira, C. R., Espectrometria de Massas: Revolução em Ciências Biológicas, FZEA, 2010.

Gamboa, L.A.P., Zalán, P.V., Brandão, A.S.L., Milani, E.J., Petróleo na margem Continental Brasileira: Geologia, Exploração, resultados e Perspectivas, Brazilian Journal of Geophysics, 2000, V. 18, 351-396.

Gillis, M., Van Van, T., Bardin, R. & 7 other authors (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. Int J Syst Bacteriol 45, 274-289.

Gomez, E., Santos, V. E., Alcon, A. “Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on Biodesulfurization (BDS) Capability”, Energy & Fuels, 2006, 20, p. 1565-1571.

Görg, A., et al., The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, 2000, 21:1037-1053.

Gruber, T., Chmiel, H., Kappeli, O., 1993, “Integrated process for continuous rhamnolipid biosynthesis”. In: Kosaric, N. (ed), Biosurfactants (Surfactants Science Series) 48, chapter 5, pp. 157-173.

Guerra-Santos, L.H., Kappeli, O., Flechter, A., Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl Microbiol Biotechnol, 1986, v.24, p. 443–448.

Haba, E., Espuny, M. J., Busquets, M., “Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils”, Journal of Applied Microbiology, 2000, 88, p. 379-387.

Hendrickson, C.L.; Beu, S.C. and Marshall, A.G., SIMION Modeling of Ion Image Charge for FT-ICR Trap Optimization, 24th Asilomar Conf. on Mass Spectrometry: New Methods, Instrumentation, and Applications of Ion Traps, Asilomar, CA, October 10-14 (2008)

Hitsatsuka, K., Nakahara, T., Sano, N., Yamada, K., 1971. “Formation of a rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation”, Agricultural and Biological Chemistry 35, 686–692.

Hubert, J., Plé, K., Hamzaoui, M., Nuisser, G., Hadeif, I., Reynaud, R., Guilleret, A., Renault, J-H., New perspectives for microbial glycolipid fractionation and purification processes. *Comptes Rendus Chimie*, 2012, 15, 18-25.

Itoh, S., Suzuki, T., Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. *Agric Biol Chem*, 1972, v.36, p.2233–2235.

Javaheri, M.J., Jenneman, G.E., McInnerney, M.J., Knapp, R.M., Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus liqueniformis* JF-2. *Appl Environ Microbiol*, v.50, p.698–700, 1985.

Kawashima, H., Nakahara, T., Oogaki, M., Tabuchi. Extra-cellular production of amanosyl-erythritol lipid of amutant of *Candida sp.* Form n-alkanes and tryacilglycerols. *J Ferment Technol*, v.61, p.143–148, 1983.

Kitamoto, D., Isoda, H., Nakahara, T., Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants--from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94, p. 187-201.

Lee, Y., Lee, S. Y., Yang J. W., Production of rhamnolipid biosurfactant by fed-batch culture of *Pseudomonas aeruginosa* using glucose as a sole carbon source. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 1999, 63:946-947.

Lin, S. C., Biosurfactants: Recent advances, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1996, 66, p. 109-112.

MacDonald, C.R., Cooper, D.G., Zajic, J.E., Surface active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*, v.41, p.117–123, 1981.

Makarov V. A., Velarde M. G., Chetverikov A. P., and Ebeling W. “Anharmonicity and its significance to non-Ohmic electric conduction”, *Physical Review E* 73, 066626(1)-(12), 2006.

Martin, M., Bosch, P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Virgili, A., Structure and bioconversion of trehalose lipids. *Carbohydr Res*, v.220, p.93–100, 1991.

Mata-Sandoval, J.C., Karns, J., Torrents, A., High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil, *Journal of Chromatography*, 1999, 864, 211-220.

Miller, D. J., Zhang, Y. M., Rock, C. O., White S. W. 2006. Structure of RhlG, an essential beta-ketoacyl reductase in the rhamnolipid biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 281:18025-18032.

Moraes, M.C. B., Lago, L.C., Espectrometria de Massas com ionização por “Electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas, Quim. Nova, Vol. 26, No. 4, 556-563, 2003.

Mulligan, C. N., Gibbs, B. F., 1989, “Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*”, Applied and Environmental Microbiology v. 55, n. 11, pp. 3016-3019.

Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z., A new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Appl Environ Microbiol, v.61, p.3240–3244, 1995.

Neves, B.C., Freire, D.M.G., Domont, G.B., Nogueira, F.C.S., Mariano, D.C.O., Silva, P.M., Tavares, L.F.D., Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*, Appl Microbiol Biotechnol, 2012, DOI 10.1007/s00253-012-4454-9

Nitschke, M. and Pastore, G. M. 2002. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. Química Nova, 2002, v.25, p. 772-776.

Nitschke, M., Costa, S. G., and Contiero, J. 2005. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. Biotechnol. Prog. 21:1593-1600.

Ochsner UA, Fiechter A, Reiser J (1994) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. J Biol Chem 269:19787–19795.

Olvera, C., Goldberg, J. B., Sanchez, R. and Soberon-Chavez, G. 1999. The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. FEMS Microbiol. Lett. 179:85-90.

Perry RH, Cooks RG, Noll RJ (2008) Orbitrap Mass Spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. Mass Spectrom Rev 27:661–699

Placwa-Plociniczak M, Plaza GA, Piotrska-Seget Z, Cameotra SS (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int J Mol Sci* 12:633–654

Química Geral, James E. Brady e Gerard E. Humiston, Editora LTC, Vol. 1, 2ª Edição, 2009, capítulo 8, pág 266 e 267.

Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS, Soberon-Chavez G (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 40:708–718

Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I.M. Enhanced bioremediation of n-alkanes in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, Essex, v.90, p.159-168, 2003.

Reiling, H. E., Thanei-Wyss, U., Guerra-Santos, L. H. et al., 1986, “Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*”, *Applied and Environmental Microbiology* v. 51, n. 5, pp. 985-989.

Rendell, N.B., Taylor, G.W., Somerville, M., Todd, H., Wilson, R., Cole, P.J., 1990.Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochim Biophys Acta*, 1045, 189-93.

Robert M. Silverstein e Francis X. Webster, Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, Editora LTC, Vol único, 6ª Edição.

Robert, M. et al. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol. Letters*, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 871-874, 1989.Rodrigues, 2003.

Rosenberg, E., Ron, E.Z., High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.52, p.154–162, 1999.

Rosenberg, E., Rubinovitz, C., Gottlieb, A., Rosenhak, S., Ron, E.Z., Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Appl Environ Microbiol*, v.54 p.317–322, 1988.



Sabra, W., Kim, E., Zeng, A., 2002, “Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures”, *Microbiology* 148, pp. 3195-3202.

Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Santos, A. S., Sampaio, A.P.W., Santa Anna, L.M., Pereira, J.R.N. and Freire, D.M.G. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in the production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002.

Santos, A. S., 2003, *Produção de ramnolipídeos por Pseudomonas aeruginosa*. Tese de D.Sc., Instituto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Sharma, P., Brown, S., Varshney, M., Moudgil, B., Surfactant-Mediated Fabrication of Optical Nanoprobes, *Adv Polym Sci*, 2008, 218, p. 189–233.

Soberón-Chavez, G., Lepini, F., Deziel, E.. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 68, p. 718-725.

Speers, G.C. Whitead, E.V. Crude petroleum. In Eglington, G. & Murphy, N.T.J., Eds. *Organic Geochemistry*. Berlin, Springer – Verlag, 1969, p.638-675.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Holnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., Olson, M. V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, 406, p. 959-964.

Suárez-Moreno, Z.R., Caballero-Mellado J., Coutinho, B.G., Mendonça-Previato, L., James, E.K., Venturi, V., Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated Burkholderia. *Microb Ecol*, 2012, 63, p.249–266.

Tavares, L. F., 2012, *Produção e Caracterização de biossurfactantes produzidos por Burkholderia*. Tese de Doutorado., Instituto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Urum, K., Pekdemir, T., Evolution of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*, Oxford, 2004, v.57, p.1139-1150.

Van Dyke, M. I., Lee, H., Trevors, J. T., Application of microbial Surfactants, *Biotechnol. Adv.* 1991, 9, p. 241-252.

Wiley, W.C., McLaren, I.H., Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution, *Review of Scientific Instruments*, 1955, Volume 26, Issue 12, pag. 1150.

Wilkinson, S.G., Galbraith, L., Studies on lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Biochem*, 1975, v.52, p.331–343.

Withold W. et al., 1995; *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, vol 33, pag. 15.

Zhang H., Hanada S., Shigematsu T., Shibuya K., Kamagata Y., Kanagawa T., Kurane R., *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 2000, 2:743-749.

Zhang, G., Wu, Y., Qian, X., Meng, Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University Science*, Hangzhou, 2005, n.8, p.725-730.

Zuckerberg, A., Diver, A., Peeri, Z., Gutnick, D.L., Rosenberg, E., Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl Environ Microbiol*, 1979, v.37, p.414–420.

## 8. ANEXO I

Este projeto de curso gerou um artigo publicado na revista Appl. Microbiol. Biotechnology.



